

Veränderungen im Proteom von Maus und Mensch durch Huntington's Chorea

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Ing. Claus Zabel,

geboren am 18. März 1970 in Marktoberdorf

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. rer. nat. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Harald Saumweber
 2. Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Joachim Klose
 3. Prof. Dr. rer. nat. Hanspeter Herzel

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Januar 2003

Zusammenfassung

Die Erkrankung Huntington's Chorea ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die gewöhnlich im mittleren Lebensabschnitt beginnt und unausweichlich zum Tode führt. In unserem Bestreben, Proteine zu identifizieren, welche an Prozessen „Upstream“ oder „Downstream“ des krankheitsverursachenden Proteins Huntingtin beteiligt sind, wurde das Proteom eines sehr gut etablierten Mausmodells mit Hilfe der Großgel 2D-Elektrophorese untersucht. Es konnte zum ersten Mal auf Proteinebene nachweisen werden, dass die Expression von zwei Serinproteasehemmern, α 1-Antitrypsin und Contraspin und darüber hinaus eines Chaperons, α B-Kristallin, im Verlauf der Erkrankung abnimmt. Reduzierte Expression von α 1-Antitrypsin und Contraspin konnte in Gehirn, Leber, Herz und Testes nahe dem Endstadium der Erkrankung nachgewiesen werden. Hier ist es wichtig festzustellen, dass die Expressionsabnahme von α 1-Antitrypsin im Gehirn der Abnahme in der Leber im Herzen und in den Testes vorangeht. Eine verminderte Expression des Chaperons α B-Kristallin wurde nur im Gehirn gefunden. Für ein weiteres Protein, das Major Urinary Protein, wurde eine verminderte Expression in der Leber und im Urin von betroffenen Mäusen festgestellt. Damit konnte demonstriert werden, dass die Erkrankung auf Proteinebene auch ein Protein, das im Gehirn von transgenen Mäusen nicht vorkommt, beeinflusst. Bei Untersuchungen am Menschen wurde in drei Gehirnregionen von Postmortem-Gehirnen von Huntington's Chorea Patienten eine veränderte Expression von α 1-Antitrypsin festgestellt. Wenn gewährleistet werden kann, dass die Konzentration von α 1-Antitrypsin und α B-Kristallin während Huntington's Chorea im Gewebe nicht absinkt, könnte dies vielleicht neuronalen Zelltod verhindern und somit bei der Verzögerung des Krankheitsverlaufs nutzbringend eingesetzt werden.

Abstract

Huntington disease is an autosomal dominantly inherited disease that usually starts in midlife and inevitably leads to death. In an effort to identify proteins involved in processes upstream or downstream of the disease causing huntingtin, the proteome of a well-established mouse model was studied by large-gel 2D electrophoresis. It could be demonstrated for the first time at the protein level that two serin protease inhibitors, α 1-antitrypsin and contraspin and the chaperone α B-crystallin decrease in expression over the course of disease. Importantly, the α 1-antitrypsin decrease in the brain precedes that in liver, heart and testes in mice. Reduced expression of α 1-antitrypsin and contraspin could be detected in the brain, liver heart and testes close to terminal disease. Decreased expression of the chaperone α B-crystallin was found exclusively in the brain. Reduced expression of the liver specific major urinary proteins not found in the brain, was seen in affected mice, demonstrating that the disease exerts its influence on a protein not present in the brain of transgenic mice at the protein level. When investigating three human brain regions obtained post-mortem from Huntington's disease patients, α 1-antitrypsin expression was also altered. Maintaining α 1-antitrypsin and α B-crystallin availability during the course of Huntington's disease might prevent neuronal cell death and therefore could be useful in delaying the disease progression.

Schlagwörter

α 1-Antitrypsin, Contraspin, α B-Kristallin, Huntington's Chorea, R6/2, Chaperon, Serin-Protease-Hemmer, MUPs, Großgel 2D-Elektrophorese.

Keywords

α 1-antitrypsin, contraspin, α B-crystallin, Huntington's disease, R6/2, chaperone, serine protease inhibitor, MUPs, large-gel 2D electrophoresis.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | 1 |
| Abstract | 3 |
| Abkürzungsverzeichnis | 14 |
| Vorwort | 15 |
| 1 Einleitung | 16 |
| 1.1 <i>Neurodegenerative Erkrankungen hervorgerufen durch verlängerte Poly-Glutamin-Wiederholungen</i> | 16 |
| 1.2 <i>Die Erkrankung HD</i> | 16 |
| 1.3 <i>Ursache der Neurodegeneration bei HD</i> | 18 |
| 1.3.1 Zelltod bei Neuronen durch toxische Peptidfragmente | 19 |
| 1.3.1.1 Toxische Peptidfragmente sind nur eines von vielen Signalen die Apoptose in der Zelle auslösen können | 19 |
| 1.3.1.2 Verlauf der Apoptose in der Zelle | 20 |
| 1.3.1.3 Mechanismen, die das Überleben der Zelle sichern | 21 |
| 1.3.2 Neurodegeneration als Folge von verstärktem Widerstand von mutiertem Htt gegenüber Proteolyse | 21 |
| 1.3.3 Bewertung der „toxischen Peptid“ und der „verminderte Proteolyse“ Hypothese | 23 |
| 1.4 <i>Mausmodelle für die Erkrankung Huntington's Chorea</i> | 25 |
| 1.4.1 Mausmodelle für HD mit „Knock in“ von „Full length“ IT15 mit expandiertem CAG | 25 |
| 1.4.2 Mausmodelle generiert durch verkürzte Fragmente von IT15 mit expandierten CAG Wiederholungen | 25 |
| 1.4.3 Expressionsveränderung auf RNA Niveau bei R6/2 Mäusen | 26 |
| 1.4.4 Veränderung bei R6/2 Mäusen auf der Proteinebene | 28 |
| 1.5 <i>Durchführung einer Proteomics Studie für HD</i> | 28 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1.5.1 | Allgemeine Grundlagen für eine Proteomics Studie | 29 |
| 1.5.2 | Eingrenzung der Vielfalt bei der Proteomics Studie | 29 |
| 1.5.3 | Auswahl eines geeigneten Modellsystems für HD | 30 |
| 1.5.4 | Verfügbarkeit der Proben bei Maus und Mensch | 31 |
| 1.5.5 | Erkenntnisgewinn aus einer Proteomics Studie | 32 |
| 2 | Zielsetzung | 33 |
| 3 | Ergebnisse der Dissertation im Überblick | 33 |
| 4 | Materialien und Methoden | 35 |
| 4.1 | <i>Tiere und Gewebe</i> | 35 |
| 4.2 | <i>Gewinnung von Gehirnregionen und anderen Geweben</i> | 35 |
| 4.3 | <i>Herstellung von Proteinproben</i> | 36 |
| 4.3.1 | Konzept | 36 |
| 4.3.2 | Durchführung der Proteinextraktion | 37 |
| 4.3.2.1 | Plasmatische Fraktion | 37 |
| 4.3.2.2 | Membranfraktion | 41 |
| 4.3.2.3 | Kernfraktion | 42 |
| 4.3.2.4 | Körperflüssigkeiten | 43 |
| 4.4 | <i>Großgel 2D-Elektrophorese</i> | 43 |
| 4.4.1 | Die erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF) | 44 |
| 4.4.1.1 | Reinigung der 1D Gelröhrchen | 44 |
| 4.4.1.2 | Herstellung der 1D Gele | 44 |
| 4.4.1.3 | Probenauftrag und IEF Lauf | 46 |
| 4.4.2 | Die zweite Dimension: Grossgel SDS-PAGE | 50 |
| 4.4.2.1 | Gießen der Separationsgele | 50 |
| 4.4.2.2 | SDS-PAGE Lauf | 51 |
| 4.5 | <i>Anfärbung der Proteine</i> | 53 |
| 4.5.1 | Saure Silberfärbung zur Spoterkennung | 54 |
| 4.5.2 | Coomassie Brilliant Blue G250 Färbung zur Spotidentifizierung | 55 |
| 4.6 | <i>Trocknung der 2D Gele</i> | 55 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.7 | <i>Spoterkennung</i> | 56 |
| 4.8 | <i>In-Gel Verdau</i> | 57 |
| 4.9 | <i>MALDI-TOF-Massenspektrometrie</i> | 57 |
| 4.10 | <i>Datenbanksuche auf Grundlage der Peptidmassenfingerprint-Spektren</i> | 58 |
| 4.11 | <i>Automatische Interpretation der Fragmentionen Spektren:</i> | 58 |
| 5 | Ergebnisse | 59 |
| 5.1 | <i>Untersuchung des Gehirnpoteoms bei der Maus und beim Menschen</i> | 59 |
| 5.1.1 | Differentielle Proteinexpression nahe dem Endstadium der Erkrankung im Gehirn bei der Maus | 60 |
| 5.1.1.1 | R6/2 Mausgehirne zeigen keine Expression von α 1-Antitrypsin 1-5 nahe dem Endstadium der Erkrankung | 60 |
| 5.1.1.1.1 | α 1-Antitrypsin1-5 ist in der zytoplasmatischen Fraktion von R6/2 Mäusen nicht mehr nachweisbar | 60 |
| 5.1.1.1.2 | α 1-Antitrypsin in Membran- und Kernfraktion | 61 |
| 5.1.1.2 | Verminderte Expression von Contraspin im Gehirn von R6/2 Mäusen | 62 |
| 5.1.1.3 | R6/2 Mausgehirne nahe dem Endstadium der Erkrankung zeigen eine reduzierte Expression von α B-Kristallin | 64 |
| 5.1.1.3.1 | Verminderte Expression von α B-Kristallin in der zytoplasmatischen/nukleoplasmatischen Fraktion | 64 |
| 5.1.1.3.2 | Geringere Expression von ABC nahe dem Endstadium der Erkrankung bei R6/2 Mäusen auch in der Membran- und Kernfraktion | 64 |
| 5.1.2 | Expression von AAT 1-5 und ABC während des Krankheitsverlaufes bei der Maus | 64 |
| 5.1.2.1 | Verminderung der Expression von AAT 1-5 mit dem Fortschreiten der Erkrankung | 66 |
| 5.1.2.2 | Verminderung der Expression von ABC mit dem Fortschreiten der Erkrankung | 67 |
| 5.1.3 | Untersuchung der Geschlechtsspezifität der Expression der differentiell exprimierten Proteine bei der Maus | 68 |

| | | |
|---------|--|----|
| 5.1.3.1 | Geringere Expression von AAT 1-5 in weiblichen als in männlichen Mäusen | 68 |
| 5.1.3.2 | Gleiches Expressionsniveau von ABC in weiblichen und männlichen Mäusen | 69 |
| 5.1.4 | Veränderte Proteinexpression im Endstadium der Erkrankung beim Menschen | 69 |
| 5.1.4.1 | Veränderte Expression von AAT bei HD postmortem Gehirnen | 69 |
| 5.1.4.2 | Expression von ABC ist im menschlichen Gehirn nicht nachweisbar | 73 |
| 5.2 | <i>Expression von krankheitsrelevanten Proteinen in verschiedenen Geweben</i> | 73 |
| 5.2.1 | Voruntersuchung zur Expression von AAT 1-5 und ABC in verschiedenen Geweben und Gehirnregionen | 73 |
| 5.2.1.1 | Expression von AAT 1-5 in unterschiedlichen Geweben | 73 |
| 5.2.1.2 | ABC Expression in unterschiedlichen Geweben | 74 |
| 5.2.2 | Untersuchung der differentiellen Proteinexpression im Herzen | 76 |
| 5.2.2.1 | Verringerte Expression von AAT im Herzen von R6/2 Mäusen | 76 |
| 5.2.2.2 | Verminderte Expression von Contraspin im Herzen von R6/2 Mäusen | 77 |
| 5.2.2.3 | Gleiche Expression von ABC in R6/2 – und Kontrollmäusen | 78 |
| 5.2.2.4 | Expression von AAT und CTS im Verlauf der Erkrankung | 78 |
| 5.2.3 | Untersuchung der differentiellen Expression von AAT, CTS und ABC in den Testes | 79 |
| 5.2.3.1 | Verminderte Expression von AAT in den Testes von R6/2 Mäusen | 80 |
| 5.2.3.2 | Verminderte CTS Expression in den Testes von R6/2 Mäusen | 81 |
| 5.2.3.3 | Verminderte Expression von AAT und CTS im Verlauf der Erkrankung | 82 |
| 5.2.4 | Untersuchung der differentiellen Expression von AAT, CTS und ABC in der Leber | 82 |
| 5.2.4.1 | Verminderte Expression von AAT in der Leber von R6/2 Mäusen | 82 |
| 5.2.4.2 | Verminderte CTS Expression in der Leber von R6/2 Mäusen | 83 |
| 5.2.4.3 | Stark verminderte Expression von Major Urinary Proteins in der Leber von R6/2 Mäusen | 84 |
| 5.2.4.4 | Expression von AAT, CTS und MUPs im Krankheitsverlauf | 85 |
| 5.2.5 | Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Untersuchung verschiedener Gewebe | 86 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 6 | Diskussion | 87 |
| 6.1 | <i>Verhinderung von Zelltod durch AAT</i> | 87 |
| 6.1.1 | Aufgabe von AAT im Organismus | 87 |
| 6.1.2 | Charakterisierung und Bewertung der AAT Expression bei HD bei Maus und Mensch | 88 |
| 6.1.2.1 | Maus | 88 |
| 6.1.2.2 | Mensch | 88 |
| 6.1.3 | Differentielle Expression unterschiedlicher AAT Varianten bei Mensch und Maus | 89 |
| 6.1.3.1 | Zwei Proteinisoformen von AAT bei Maus und Mensch repräsentieren zwei Zustände im gleichen Prozess | 89 |
| 6.1.3.2 | Gemeinsamer Wirkmechanismus für AAT in humanem und murinem HD trotz unterschiedlicher Anzahl an AAT Proteinen zwischen den Spezies | 90 |
| 6.1.4 | Mechanismus der Zelltodhemmung durch AAT | 91 |
| 6.2 | <i>Verminderte ABC Expression im Verlauf der Erkrankung</i> | 92 |
| 6.3 | <i>Veränderte MUPs Expression bei transgenen R6/2 Mäusen</i> | 94 |
| 7 | Zusammenfassung | 96 |
| | Literaturverzeichnis | 97 |
| | Anhang | 110 |
| | Danksagung | 113 |
| | Lebenslauf | 114 |
| | Eigene Veröffentlichungen | 115 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 116 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: Neurotransmitterrezeptoren bei HD | 27 |
| Abb. 2: Speziesübergreifende Ähnlichkeit der Spotmuster und Vergleich der Reproduzierbarkeit bei der Spezies Maus und Mensch | 31 |
| Abb. 3: Großgel 2D Elektrophorese: Erste und zweite Dimension | 47 |
| Abb. 4: AAT 1-5 Expression im Gehirn bei R6/2 Mäusen nahe dem Endstadium der Erkrankung in der zytoplasmatischen/nukleoplasmatischen Fraktion. | 61 |
| Abb. 5: Expression von AAT1-5 in der Membranfraktion nahe dem Endstadium der Erkrankung. | 63 |
| Abb. 6: Expression von AAT 1-5 in der Kernfraktion nahe dem Endstadium der Erkrankung. | 63 |
| Abb. 7: Expression von ABC im Gehirn von R6/2 Mäusen nahe dem Endstadium der Erkrankung in der zytoplasmatischen/nukleoplasmatischen Fraktion. | 65 |
| Abb. 8: ABC Expression in der Membranfraktion nahe dem Endstadium der Erkrankung. | 65 |
| Abb. 9: ABC Expression in der Kernfraktion nahe dem Endstadium der Erkrankung. | 66 |
| Abb. 10: AAT Expression im Verlauf der Erkrankung. | 67 |
| Abb. 11: ABC Expression im Verlauf der Erkrankung. | 68 |
| Abb. 12: Expression von AAT in drei Regionen von Postmortem-Gehirnen beim Menschen. | 70 |
| Abb. 13: Expression von AAT im vorderen Gyrus Cinguli bei Postmortem-Gehirnen. | 72 |
| Abb. 14: Expression von AAT im Blut (Plasma) von einem HD Patienten während der Erkrankung | 72 |
| Abb. 15: Verteilung der ABC Expression in verschiedenen Gehirnregionen | 75 |
| Abb. 16: AAT und CTS Expression im Herzen nahe dem Endstadium der Erkrankung. | 76 |
| Abb. 17: Expression der 170 kDa Isoform von CTS. | 77 |
| Abb. 18: Unveränderte Expression von ABC im Herzen nahe dem Endstadium der Erkrankung. | 78 |
| Abb. 19: Expression von AAT in Testes nahe dem Endstadium der Erkrankung | 81 |
| Abb. 20: Expression von AAT und CTS in der Leber während des Endstadiums der Erkrankung. | 83 |
| Abb. 21: MUPs Expression in der Leber nahe dem Endstadium der Erkrankung | 84 |
| Abb. 22: Stark reduzierte MUPs Expression im Urin von R6/2 Mäusen nahe dem | |

Endstadium der Erkrankung

85

Abb. 23: Darstellung der drei Proteinfractionen am Beispiel der Leber von C57Bl/6
Mäusen

112

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tab. 1: Pathologie bei HD – Basis, Phänotyp, Pathologie und molekulare Grundlagen | 24 |
| Tab. 2: Zusammenfassung der Arbeitsschritte für die Proteinextraktion in verschiedenen Geweben | 38 |
| Tab. 3: Chemische Zusammensetzung des Separationsgels | 45 |
| Tab. 4: Chemische Zusammensetzung des Capgels | 46 |
| Tab. 5: Chemische Zusammensetzung von SDS-PAGE Gelen | 51 |
| Tab. 6: Expression von AAT 1-5 und ABC im Verlauf der Erkrankung | 62 |
| Tab. 7: Beschreibung der menschlichen HD und Kontrollgewebe und Blutplasmaanalysen | 70 |
| Tab. 8: Verteilung von AAT 1-5 und ABC im Gewebe und in Gehirnregionen. Verteilung im Gewebe (Oben). : Verteilung in den Gehirnregionen von weiblichen Mäusen (Unten) | 74 |
| Tab. 9: : Differentielle Proteinexpression in verschiedenen Geweben. Expression von AAT 1-5 in verschiedenen Geweben ^[a] (Oben). Expression von MUPs im Krankheitsverlauf (Unten). | 79 |
| Tab. 10: Expression der beiden CTS Isoformen. 70 kDa Isoform in verschiedenen Geweben (Oben). 170 kDa Isoform im Herzen (Unten). | 80 |
| Tab. 11: Zusammenstellung des Expressionsniveaus von Proteinen, welche HD-spezifisch verändert wurden nahe dem Endstadium der Erkrankung ^[a] | 86 |
| Tab. 12: Identifizierung von Proteinspots, welche sich in ihrer Expression zwischen zwei HD Patienten in Abhängigkeit von Geschlecht und Gehirnregion unterscheiden. | 110 |
| Tab. 13: Untersuchung der HD-spezifischen Spotunterschiede beim vorderen Globus Cinguli bei post-mortem Gehirnen von vier weiblichen HD Patienten. | 111 |

Widmung

Für Christina

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| 1D | 1. Dimension |
| 2D | 2. Dimension |
| AAT | α 1-Antitrypsin |
| ABC | α B-Kristallin (α B-crystallin) |
| AD | Alzheimer (Krankheit) |
| Apaf-1 | Apoptotic-Protease-Activating-Factor-1 |
| BDNF | gehirnabgeleitete, neurotrophe Substanz („brain-derived neurotrophic factor“) |
| CTS | Contraspin |
| DTT | Dithiothreitol |
| EPW | Expandierte Polyglutaminwiederholungen |
| GFAP | Glial Fibrillary Acidic Protein |
| HD | Huntington's Chorea (Huntington Erkrankung) |
| Hsp | Hitzeschock Protein (Heat Shock Protein) |
| Htt | Huntingtin |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| MALDI | Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization |
| MUPs | Major Urinary Proteins |
| NII | Neuronale Intranukleäre Einschlüsse (neuronal intranuclear inclusions) |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| PWG | Polyglutaminwiederholung(en) |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SERPIN | Serin Protease Hemmer (serine protease inhibitor) |
| UPM | Umdrehungen pro Minute |

Vorwort

An der „Redwing Health Clinic“ in Redwing, MN, USA, hängt ein verblissenes Bild in Scotty Redfords Zimmer. Ein junger, gutaussiehender Mann in einer „Football-Montur strahlt in die Kamera. Nun, im Alter von 33, vermisst Scotty diese Tage. Als Jugendlicher ein Football Ereignis, wurde bei ihm vor 15 Jahren im Alter von 18 auf Huntington’s Chorea getestet und das Leiden diagnostiziert. Nachdem er mit angesehen hatte, wie seine Mutter verfiel und letztendlich aufgrund der Erkrankung starb, sieht sich Scotty nun mit seiner eigenen schwindenden Muskelkontrolle konfrontiert. Obwohl er immer noch gut aussieht und lächelt, ist er an den Rollstuhl gefesselt und hat Schwierigkeiten beim Sprechen und Essen. Scotty ist einer von ungefähr 30.000 Amerikanern, die diese Krankheit haben, ein im Erwachsenenalter beginnendes, dominant vererbtes Leiden, welches durch den Tod von Neuronen verursacht wird, die den Bewegungsapparat kontrollieren. Ungewollte Muskelbewegungen, Wahrnehmungsbeeinträchtigungen und Verhaltensabnormalitäten kennzeichnen Huntington’s Chorea. ... (aus [1]).



Der Huntington Patient Scott Redford im Alter von 18 (links) und 33 Jahren (rechts) [1].

1 Einleitung

Neurodegenerative Erkrankungen sind erblich oder sporadisch auftretende Zustände, welche durch fortschreitende Fehlfunktion des Nervensystems gekennzeichnet sind. Diese Erkrankungen sind oft mit der Atrophie (Verkümmerung) der betroffenen zentralen und peripheren Nervensystemstrukturen verbunden [2]. Die am häufigsten vorkommende neurodegenerative Erkrankung ist Alzheimer (AD), von der 7% - 10% aller Menschen über 65 Jahre und ungefähr 40 % der über 80-Jährigen betroffen sind [3]. An Parkinson eine weitere, häufige Gehirnerkrankung leiden in den Vereinigten Staaten von Amerika ungefähr eine Million Menschen [4]. Neben diesen häufigen neurodegenerativen Erkrankungen gibt es seltene, meist auf einzelne Gendefekte zurückzuführende Leiden. Die Ursache einiger dieser Erkrankungen ist die Verlängerung eines instabilen, Trinukleotids, welches sowohl in der kodierenden (Exon), als auch in der nichtkodierenden Sequenz (Intron) liegen kann. Beispiele für das Vorkommen in einem Intron sind das Fragile X Syndrom und die Myotonische Dystrophie [5]. Beim Vorkommen des Trinukleotids in einem Exon, kodiert dieses bei einigen Erkrankungen für die Aminosäure Glutamin [5, 6]. Ein Beispiel für so eine Erkrankung ist Huntington's Chorea (HD).

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen hervorgerufen durch verlängerte Poly-Glutamin-Wiederholungen

Die Zahl der neurodegenerativen Erkrankungen, die auf die Verlängerung einer instabilen Poly-Glutamin-Wiederholung (poly-glutamine-repeat; PGW) zurückgeführt werden kann, wächst ständig. Bisher sind mindestens acht unterschiedliche, sogenannte Polyglutaminerkrankungen bekannt geworden. Diese reichen von der Spinobulbaren Muskulären Atrophie über die Spinozerebralen Ataxien (SCA) bis hin zu HD [6]. HD tritt in einem von 10,000 Menschen auf [7]. An Huntington's Chorea leiden ungefähr 30.000 Amerikaner [1] und sie ist somit eine der häufigsten, monogenetisch verursachten, neurodegenerativen Erkrankungen.

1.2 Die Erkrankung HD

Die neurodegenerative Erkrankung HD ist eine autosomal dominant vererbte Krankheit, die gewöhnlich im mittleren Lebensabschnitt beginnt und nach ungefähr 15 bis 20 Jahren

unausweichlich zum Tode führt [7, 8]. Die krankheitsverursachende Mutation besteht aus einer instabilen, verlängerten CAG-Trinukleotid Wiederholung 5' im ersten Exon des HD Gens, IT15, welche für eine Kette von Polyglutaminen kodiert [9]. Die Anzahl der Glutaminwiederholungen im Genprodukt Huntingtin (Htt) [9] ist einer der entscheidenden Faktoren, die den Zeitpunkt des Ausbruchs der Erkrankung bestimmen. Menschen mit 6 – 25 Glutaminen sind nicht betroffen. Sobald zumindest eines der Allele des Gens die Schwelle von 36 Wiederholungen überschreitet kommt es zum Ausbruch der Erkrankung [10, 11]. Je größer die Zahl der PGW desto früher im Leben bricht die Krankheit aus [8]. Ein wichtiges Kennzeichen von HD ist der Untergang von vorwiegend mittelgroßen, dornigen Neuronen im Striatum des Gehirns [12]. Htt ist ein im Gehirn in weitem Umfang exprimiertes Protein. Es wurde mit Vesikeltransport [13], dem Endosomal-Lysosomalen Stoffwechselweg [14] und mit der Regulation der Produktion eines aus dem Neokortex abgeleiteten Faktors, „brain-derived neurotrophic factor“, BDNF in Verbindung gebracht [15]. BDNF ist ein für das Überleben von Neuronen des Striatums, welche bei HD sterben, wichtiger Faktor. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Htt mit expandierten Polyglutaminwiederholungen (EPW) die Histonazetylierung hemmt und zwar entweder durch das blockieren von Histonazetylasen oder durch deren „Einbinden“ in Aggregate [16, 17]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass Histon-Deazylase-Hemmer die Toxizität von EPW vermindern können [18]. Die Regulation der Aggregation von Htt-Fragmenten mit EPW könnte durch das Protein Arfaptin 2 erfolgen [19]. Eine weitere potentielle Funktion von Htt könnte in der Verhinderung des Zelltodes durch die Interaktion mit dem Protein Hip-1 bestehen. Eine Verlängerung der PGW führt zu einer Verminderung der Bindungsfähigkeit an dieses Protein. Hip-1 interagiert daraufhin mit Hippin 1 was zu einer Rekrutierung von Kaspase 8 führen könnte. Mit Hilfe des extrinsischen, rezeptorvermittelten Zelltodpfades, an dem Kaspase 8 beteiligt ist, könnte so Apoptose ausgelöst werden [20]. Apoptose ist ein Prozess, bei dem eine vorher festgelegte Abfolge von biochemischen und morphologischen Veränderungen es der Zelle erlaubt, zu sterben, ohne dass sie ihre Nachbarn beeinträchtigt [21]. Diese Literaturdaten zeigen, dass es bereits viele Anhaltspunkte für eine mögliche Funktion von Huntingtin „in vivo“ gibt, jedoch eine eindeutige Klärung immer noch nicht vorliegt, da fast alle Experimente „in vitro“ durchgeführt wurden und deshalb nur Möglichkeiten für die Funktion „in vivo“ darstellen können.

1.3 Ursache der Neurodegeneration bei HD

An dieser Stelle ist es wichtig festzustellen, dass die ursprünglichen genetischen und umweltbedingten Signale, die den Untergang von Neuronen auslösen, sich bei den verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen von unterschiedlichen (neurodegenerativen) Erkrankungen unterscheiden mögen, dass aber gemeinsame Mediatoren, Aggregatbildung [6] und toxische Fragmentbildung (AD und HD) [21], existieren. Diese Aggregate finden sich sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma [22]. Die sich an die Aggregat- und/oder Fragmentbildung anschließenden, biochemischen Abläufe, die während der Neurodegeneration ablaufen, sind apoptoseähnlich und könnten hoch konserviert sein [21]. Die Ursache des Sterbens der Neuronen im Gehirn sowie die Art des Zelltodes bei HD konnte noch nicht genau bestimmt werden [23]. Um eine Vorstellung über den Prozess der Neurodegeneration zu erhalten wird dieser im folgenden anhand seiner Gemeinsamkeiten mit Apoptose im Mausmodell und am Menschen beschrieben. Die bisherigen Daten über den Mechanismus wie Neuronen bei HD sterben sprechen dafür, dass ähnliche Prozesse wie bei Apoptose wichtig sind. Beim Zelltod durch Apoptose spielt die Aktivierung von Kaspasen eine wichtige Rolle. Dies sind Cystein-abhängige Proteasen, die auf der C-terminalen Seite die Peptidbindung bei der Aminosäure Aspartat schneiden [24]. Toxische Fragmente, die möglicherweise von Kaspasen generiert werden, spielen neben HD auch bei Alzheimer eine Rolle und lösen in „in vitro“-Modellen der Erkrankungen Apoptose aus [21]. In der Literatur existieren zwei Haupthypothesen für das Signal das zum Untergang von Neuronen bei HD führt. Nach der ersten Theorie, der „toxischen Peptid“-Hypothese, entstehen nach Kaspasespaltung kleine, N-terminale Fragmente von mutiertem Htt, die eine erhöhte Anzahl an PGW besitzen. Diese Fragmente akkumulieren selektiv im Gehirn von an HD Erkrankten und verursachen aufgrund eines noch nicht genau aufgeklärten Mechanismus Neurodegeneration [25, 26]. Die zweite Hypothese geht davon aus, dass Htt mit EPW resistenter gegenüber Proteolyse ist, da sich die Löslichkeitseigenschaften durch die Mutation verändert haben und das Protein nun schwerer löslich ist. Dies erlaubt es dem Protein zu akkumulieren und Proteine aus wichtigen Stoffwechselwegen und auch Htt mit normaler Anzahl von PGW an sich zu binden und so Neuronen zu schädigen [27].

1.3.1 Zelltod bei Neuronen durch toxische Peptidfragmente

Für die „toxische Peptid“ Hypothese spricht, dass Peptide bei Postmortem-Gehirnen von HD Patienten und Kontrollen gefunden wurden, die durch eine Spaltung von Htt durch Kaspase 3 entstanden sein könnten [28]. Zuvor wurden bereits potentielle Schnittstellen in Htt für die Kaspasen 3 und 6 nahe dem N-Terminus identifiziert [29, 30]. Es konnte gezeigt werden, dass N-terminale Fragmente im Gehirn von Menschen [31, 32] und Mäusen [33, 34] aggregieren und hierbei durch gehirnregionsspezifische Proteolyse gezielt zytotoxisch wirken könnten [35]. Ein Anhaltspunkt hierfür ist, dass N-terminale Htt Fragmente mit EPW „in vitro“ Apoptose auslösen können [36]. Die „toxische Peptid“ Hypothese mit der Involvierung von Kaspasen wird außerdem von der Beobachtung gestützt, dass sich Kaspase-Inhibitoren positiv auf das Überleben von Zellen bei HD auswirken [29, 36, 37, 38]. Charakteristisch für Apoptose ist neben der Kaspase-Aktivierung oxidativer Stress, gestörte Kalzium Homöostase (Gleichgewicht) und die Fehlfunktion der Mitochondrien [24]. Es gibt Hinweise dafür, dass auch diese Prozesse bei HD eine Rolle spielen.

1.3.1.1 Toxische Peptidfragmente sind nur eines von vielen Signalen die Apoptose in der Zelle auslösen können

Signale, welche Apoptosis in Neuronen auslösen sind vielfältig. Beispiele dafür sind der Mangel an neurotrophen Faktoren [39] oder der anregende Neurotransmitter Glutamat, welcher vermittelt durch die ionotropen Glutamatrezeptoren des Typs AMPA (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol Propionat) und NMDA (N-Methyl-D-Aspartat), Apoptose auslöst. Bei einem Mausmodell für HD (R6/2) ist die Expression von AMPA während der Erkrankung vermindert [40], was möglicherweise auf eine Herunterregulierung nach übermäßiger Aktivierung des AMPA-Rezeptors zurückzuführen ist. Bei Apoptose spielt Kalziuminflux in die Zelle eine wichtige Rolle. Ein wichtiger Auslöser für neuronalen Zelltod ist auch verstärkter, oxidativer Stress, hervorgerufen durch freie Radikale, wie zum Beispiel dem Superoxid-Anion und dem Hydroxyl Radikal. Bei R6/1 Mäusen, einem weiteren Mausmodell für HD [41] erfolgt eine oxidative Schädigung des Striatums parallel zum neurologischen Phänotyp [42]. Radikale beschädigen zelluläre Lipide [42], Proteine und Nukleinsäuren, indem sie die chemischen Bindungen dieser Moleküle angreifen.

1.3.1.2 Verlauf der Apoptose in der Zelle

Es gibt zwei bekannte Signalübertragungswege beim Zelltod durch Apoptose. Beide Wege teilen gemeinsame Eigenschaften, wie z. B. molekulare Werkzeuge, welche Kaspasen durch Pro-Enzymrekrutierung, Oligomerisierung und nähe-induzierter Autokatalyse aktivieren. Darüber hinaus sind die Abläufe jedoch relativ verschieden. Der „intrinsische“ Pfad wirkt über das Mitochondrion als generellem Schadenssensor und ein wichtiges Kennzeichen ist die Ausbildung eines Komplexes, dem „Apoptosome“, mit Prokaspase 9, Cytochrom c und dem „Apoptotic Protease Activation Factor-1“, Apaf-1. Der „extrinsische“ Pfad überträgt Signale von extrazellulären Todesliganden, die zur Tumornekrosefaktor-Superfamilie gehören (z.B. CD95L). Diese binden an einen vorgeformten Rezeptorkomplex, welcher Kaspase 8, die auch bei HD eine Rolle spielen könnte [20], aktiviert. Bei einigen Zelltypen ist dieser Pfad unabhängig davon, ob mitochondriale Veränderungen stattfinden. Andere Zellen benötigen eine Wechselwirkung mit dem intrinsischen Pfad [43]. Beide Pfade konvergieren nun und aktivieren die Effektorkaspasen 3 und 7 [43]. Effektorkaspase 3 wird im Krankheitsverlauf auch beim HD Mausmodell R6/2 aktiviert [44]. Beim „intrinsischen“ Pfad wird während der *Startphase* nach Aktivierung des „Todessignals“ eine intrazelluläre Kaskade gestartet. Zu den bei der Kaskade ablaufenden Vorgängen gehören die Zunahme der Konzentration von Oxyradikalen und von Kalzium, die Produktion von Par-4 (prostate apoptosis response-4) und die Translokation von pro-apoptotisch wirkenden Mitgliedern der Bcl-2 Familie (Bax (Bcl-2-associated X-protein) und Bad (Bcl-associated death promotor)) an die mitochondriale Membran. Die *Effektorphase* beinhaltet einen Anstieg der mitochondrialen Kalzium- und der Oxyradikalen-Konzentration, die Bildung von „Permeability Transition Pores“ (PTP) in der mitochondrialen Membran und eine Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol [45, 46]. Cytochrom c bildet nun einen Komplex mit Apaf-1 und Kaspase 9. Aktivierte Kaspase 9 wiederum aktiviert Kaspase 3 und startet so die *Abbauphase* der Apoptose. Bei dieser werden strukturelle Komponenten mit Schlüsselfunktionen in der Zelle, wie z. B. beim Zytoskelett, Kernproteine und zahlreiche Proteine aus Signalkaskaden [24], sowie auch möglicherweise Htt [29, 30] zerschnitten, was zu charakteristischen Veränderungen in der Plasmamembran führt. Die Zellen schlagen Bläschen und präsentieren Phosphatidylserine auf der Zelloberfläche, was ein Signal für die Stimulation von Zellphagozytose durch Makrophagen und Mikroglia ist. Abschließend kondensiert und fragmentiert das nukleäre Chromatin [21]. Es gibt bereits Anhaltspunkte

für DNA-Fragmentierung bei HD [47, 48], die jedoch nicht immer bestätigt werden konnte [23]. Wichtige Kennzeichen für Apoptose, wie apoptotische Körperchen und Bläschenbildung, konnten im Kern und/oder Zytoplasma jedoch bisher nicht beobachtet werden, was genauso wie die Tatsache, dass die Organellen ihre ultrastrukturelle Integrität behalten, gegen einen rein apoptotischen Zelltod spricht [23]. Apoptotischer Zelltod findet außerdem in einem Zeitraum von Stunden bis Tagen statt. Neurodegenerative Erkrankungen entwickeln sich in einem Zeitraum von mehreren Jahren [23]. Diesen Kaskaden des Todes wirken Überlebenssignale entgegen, die Oxyradikale unterdrücken, die Kalzium Homöostase und die Funktion der Mitochondrien stabilisieren [21].

1.3.1.3 Mechanismen, die das Überleben der Zelle sichern

Ein großer Teil der strukturellen und funktionellen Komplexität des Nervensystems konnte entstehen, weil Neuronen sich nicht teilen. Die lange Lebensdauer der Neuronen erlaubt es dem Nervensystem, die kontinuierliche Funktion des Gehirns über lange Zeiträume zu gewährleisten und ein anhaltendes Gedächtnis zu kodieren. Aus diesem Grund wurde auf das Nervensystem während der Evolution ein beträchtlicher Druck ausgeübt, Mechanismen zu entwickeln, die vor Zelltod schützen. Die merklichen Symptome von neurodegenerativen Erkrankungen unterstreichen die Wichtigkeit von Mechanismen, welche die neuronale Plastizität und das Überleben der Neuronen gewährleisten. Neurotrophe Faktoren können Neuronen vor Apoptose schützen, indem sie Rezeptoren aktivieren, die über Kinasekaskaden die Produktion von Proteinen fördern, die das Überleben der Neuronen sichern [39]. Viele neurotrophe Faktoren wirken über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B [49]. Das Protein Htt sorgt für die vermehrte Produktion von BDNF, einem Neurotrophin, das sich positiv auf das Überleben von Neuronen auswirkt. Bei HD verliert Htt aufgrund der EPW diese Eigenschaft, was zu einem Mangel an BDNF bei den Neuronen und möglicherweise zu Neurodegeneration führt [15].

1.3.2 Neurodegeneration als Folge von verstärktem Widerstand von mutiertem Htt gegenüber Proteolyse

Neben der „toxischen Peptid“ Hypothese, existiert ein weiteres Modell für die Neurodegeneration bei HD, bei welchem man davon ausgeht, dass mutiertes Htt resistenter gegenüber Proteolyse ist. Es wird deswegen nicht von Proteasen abgebaut und kann

aggregieren [27]. Beide Prozesse generieren auf unterschiedliche Weise ein Signal oder Signale, welche(s) letztendlich Neurodegeneration hervorruft(en). Für den weiteren Verlauf des Untergangs der Neuronen gilt der ab 1.3.1.1 beschriebene Mechanismus. Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass Aggregate bestehend aus trunkiertem Htt mit EPW nicht zwangsläufig zytotoxisch sondern vielleicht sogar schützend wirken [36, 37, 50, 51, 52]. Studien, welche die Involvierung von toxischen N-terminalen Fragmenten postulierten, konnten nicht direkt nachweisen, dass das toxische Fragment tatsächlich von Htt mit EPW stammt [31, 35]. Eine bisher unbestätigte Studie zeigt, dass Htt mit EPW widerstandsfähiger gegenüber Proteolyse ist und dass N-terminale Spaltprodukte von Htt, welche in Inklusionen bei humanem postmortem Gehirnen gefunden wurden, nicht von Htt mit EPW stammten. Der Grad der Prozessierung von Htt war in von HD betroffenen und nicht betroffenen Gehirnregionen gleich [27]. Die unter 1.3.1 beschriebene positive Wirkung von Kaspase-Inhibitoren auf das Überleben von Zellen könnte auch dadurch zustande gekommen sein, dass diese eine allgemeinere, nicht HD-spezifische Art des Zelltodes mindern. Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass Kaspase-Inhibitoren den Zelltod zwar verzögern, aber nicht aufhalten können [37, 53]. Wenn toxische Peptide tatsächlich alleine die Ursache für den Zelltod bei HD wären, würde die Blockierung der Kaspasen den Beginn der Erkrankung verhindern [27]. Es gibt jedoch einige kritisch zu hinterfragende Punkte bei dieser Studie [27]. Die „verminderten Proteolyse“ wird bei der obigen Studie durch die Untersuchung von postmortem Gehirnen von HD Patienten mit PGW im Bereich von 40 bis 44 untersucht [27]. Die am besten untersuchten Gehirne besitzen 40 PGW und sind aufgrund der Schweregradbewertung, die von Vonsattel [54] eingeführt wurde, Grad 1 Gehirne. Grad 0 bezeichnet hierbei Gesunde und Grad 4, Gehirne im Endstadium der Erkrankung mit sehr starker Atrophie der von HD betroffenen Gehirnregionen, besonders dem Striatum. Mehrere Antikörper wurden für die Detektion von Htt verwendet, für das C-terminale, das N-terminale Ende und das Mittelstück von Htt. Ein Antikörper der speziell EPW erkennt fand ebenfalls Verwendung [55]. Dieser Antikörper detektiert spezifisch EPW ab einer Länge von 40. Die Sensitivität der Detektion ist jedoch sehr stark von der Anzahl der Wiederholungen abhängig. Der Unterschied der Sensitivität von 40 zu 80 Wiederholungen kann bis zu 80-fach betragen, ist jedoch mindestens 20-fach [55]. Die in der Studie zum Nachweis der „verminderten Proteolyse“ verwendete Probenmenge von 20 bis 35 µg Gehirnextrakt [27], bei welchem nicht alle Zellen Htt mit EPW in gleichem Maße exprimieren, ist viel geringer als die 50

µg Extrakt aus lymphoblastoiden Zelllinien mit homogener Expression von EPW, die bei der Studie für die Charakterisierung des Antikörpers verwendet wurden und bei der EPW mit 40 Wiederholungen gerade noch nachweisbar waren [55]. Eine Beteiligung von N-terminalen Fragmenten von Htt mit EPW in den Aggregaten war durch diese Studie nicht auszuschließen. Es wird deutlich, dass eine genaue Bewertung des experimentellen Ansatzes und der verwendeten Werkzeuge zur Untersuchung des Pathomechanismus bei HD sehr wichtig ist und wichtige Werkzeuge, wie z.B. Antikörper die PGW im Bereich ab 40, nicht jedoch unter 36, spezifisch mit gleichbleibender, hoher Sensitivität erkennen, immer noch fehlen.

1.3.3 Bewertung der „toxischen Peptid“ und der „verminderte Proteolyse“ Hypothese

Beide Hypothesen vermögen es, viele der bisher gemachten Beobachtungen bei der Pathologie von HD zu erklären. Beide erklären das Auftreten von Aggregaten, welche N-terminale Fragmente von Htt enthalten. Im Fall der „toxischen Peptid“ Hypothese ist die Akkumulation und möglicherweise auch Aggregation von N-terminalen Fragmenten von Htt mit EPW die Ursache für die Erkrankung. Bei der „verminderten Proteolyse“-Hypothese stammen die Fragmente von Htt ohne EPW. Die Fragmente mit EPW spielen bei der Entstehung der Pathologie keine besondere Rolle. Sie entstehen nur aufgrund der allgemeinen Prozessierung von Htt durch Kaspasen. Die Beteiligung von Kaspasen bei der Pathologie von HD hat auch einen unterschiedlichen Stellenwert. Bei der „toxischen Peptid“ Hypothese ist die Prozessierung von Htt durch Kaspasen die Ursache für die Entstehung der toxischen Fragmente, wohingegen bei der „verminderten Proteolyse“-Kaspasen nur nach der Akkumulation von Aggregaten und dem Wegfangen von verschiedenen im Stoffwechsel wichtigen Proteine durch die Aggregate, eine Rolle als „ausführende Instanz“ der Zelltodmaschinerie spielen. Obwohl beide Hypothesen die bisherigen Beobachtungen erklären können, bleibt die „toxische Peptid“ Hypothese, aufgrund der offenen Fragen bei der „verminderten Proteolyse“-Hypothese, weiterhin die am besten gestützte Theorie für die Pathologie von HD. Mausmodelle, welche ein Fragment von Htt mit EPW exprimieren sind somit ein gutes Modell für die Erkrankung [34, 41]. Nicht zuletzt die Untersuchung dieser Mausmodelle wird Aufschlüsse darüber geben, welche Prozesse beim Untergang von Neuronen in neurodegenerativen Erkrankungen wie HD im Einzelnen ablaufen, warum dieser Prozess so lange dauert und

wie stark dieser Prozess der Apoptose wirklich ähnelt. Tab. 1 fasst noch einmal die wichtigsten Bereiche der Erkrankung HD zusammen.

Tab. 1: Pathologie bei HD – Basis, Phänotyp, Pathologie und molekulare Grundlagen

| Huntington Chorea | |
|-----------------------------------|--|
| Bereich^[a] | Beschreibung |
| Ursache | <ul style="list-style-type: none"> • Vergrößerte Anzahl an CAG-Wiederholungen im ersten Exon des IT15 Gens • Expression des Genprodukts Huntingtin (Htt) mit erhöhter Anzahl der Aminosäure Glutamin • Funktion von Htt im Körper wird kontrovers diskutiert ist aber noch nicht genau geklärt |
| Funktion Htt im Organismus | <ul style="list-style-type: none"> • Vesikeltransport^[b] • Endosomaler-lysosomaler Stoffwechselweg • Regulation BDNF • Hemmung Histonazetylierung • Verhinderung von Zelltod durch Interaktion mit Hip-1 |
| Klinischer Verlauf | <ul style="list-style-type: none"> • Progression der Erkrankung meist innerhalb von 10 – 15 Jahren immer mit tödlichem Verlauf • Auftreten von Chorea^[c], Rigidität (Steifheit), Demenz (geistiger Verfall) häufig verbunden mit Zuckungen; • Je größer die Anzahl der CAG Wiederholungen, desto früher bricht die Erkrankung aus und desto schwerer ist der Verlauf |
| Pathologie | <ul style="list-style-type: none"> • Atrophie des Striatums; vor allem der Nukleus Kaudatum und das Putamen sind betroffen • Verlust von mittelgroßen, dornenförmigen Neuronen; Astrozytose [54] |
| Biochemie | <ul style="list-style-type: none"> • Bildung von intranukleären Inklusionen und neuropilen Aggregaten die im Mausmodell im Krankheitsverlauf zunehmen • Aggregate beinhalten Proteine, welche für viele Stoffwechselwege wichtig sind |
| Neurodegeneration | <ul style="list-style-type: none"> • Apoptose-ähnlicher Zelltod • Signal, welches zum Zelltod führt ist noch ungeklärt |

^[a]Eine genaue Erklärung der einzelnen Unterpunkte erfolgt im Text (1.1 bis 1.3.3). ^[b] Eine genaue Diskussion der Erkenntnisse erfolgt in 1.2.1. ^[c]Chorea: regellose, asymmetrische, plötzlich einschließende, kurzdauernde, distal betonte, unwillkürliche Bewegungen der Extremitäten; im Gesicht treten Grimassen und Schmatzen auf [56];

1.4 Mausmodelle für die Erkrankung Huntington's Chorea

1.4.1 Mausmodelle für HD mit „Knock in“ von „Full length“ IT15 mit expandiertem CAG

Es gibt unterschiedliche Mausmodelle für HD basierend auf zwei verschiedenen Ansätzen für deren Herstellung. Ein Ansatz besteht in der Inkorporation des gesamten IT15 Gens für Htt mit einer krankheitsverursachenden Anzahl von Glutaminen. Bei einem dieser Modelle mit erhöhter Anzahl von CAG Wiederholungen (eine Mauslinie mit 48 und eine mit 89) im Gen IT15 und somit der Aminosäure Glutamin im translatierten Protein, zeigen die Mäuse fortschreitende Verhaltensstörungen und Fehlfunktionen der Motorik mit einem Verlust an Neuronen und Gliose im Striatum, zerebralen Kortex, Thalamus und Hippocampus. Ein Merkmal dieses Modells ist das relativ späte Auftreten von Symptomen im Alter von ungefähr 24 Wochen. Außerdem war die Penetranz der Neuronen mit Inklusionen, einer wichtigen pathophysiologischen Eigenschaft von HD gering (~1%) [57]. In einem weiteren Modell mit gleichem Prinzip für HD wurde eine Polyglutaminsequenz von 92 bzw. 111 Aminosäuren an Stelle der 7 Aminosäuren bei der Maus als „knock in“ eingefügt. Im Verlauf der Erkrankung verändert sich die Lokalisation von „full-length“ Htt mit einer erhöhten Anzahl an Glutaminwiederholungen von zytoplasmatisch zu nukleär, bevor, in einem späteren Stadium der Erkrankung, Aggregate mit N-terminalen Fragmenten auftreten [58]. Auch bei diesem Mausmodell treten sichtbare Veränderungen, wie leichte motorische Störungen oder Neurodegeneration erst sehr spät auf und eine deutliche Ausprägung ist erst im Alter von zwei Jahren sichtbar [59]. Bei diesem Modell wird der Krankheitsprozess durch Koexpression von „knock in“ Transgen und kurzen Htt-Fragmenten mit EPW (82 Wiederholungen) beschleunigt. Im Alter von zwei Jahren treten Gliose und Neurodegeneration im Striatum dieser transgenen Mäusen auf. Die Translokation von Htt in den Nukleus der transgenen Mäusen wird durch das N-terminale Fragment ebenfalls beschleunigt.

1.4.2 Mausmodelle generiert durch verkürzte Fragmente von IT15 mit expandierten CAG Wiederholungen

Ein anderer experimenteller Ansatz basiert auf der Inkorporation eines verkürzten

Fragments des IT15 Gens. Bei einem dieser Mausmodelle führt die Translation dieses Htt-Fragments mit EPW zu einem Protein mit 82 Glutaminen und 171 Aminosäuren. Die Expression erfolgte über einen murinen Prionprotein-Promotor. Die Mäuse zeigen Verhaltensauffälligkeiten wie Verlust der Koordinationsfähigkeit, Zittern, Hypokinese und abnormalem Gang, bevor sie vorzeitig im Alter von 16 bis 52 Wochen, je nach erzeugter Mauslinie, versterben. Außerdem weisen die Mäuse im Krankheitsverlauf intranukleäre Inklusionen und neuropile Aggregate auf, welche wahrscheinlich das toxische Htt-Fragment mit EPW enthalten [34]. Ein weiteres Mausmodell mit verkürztem Htt-Fragment ist R6/2. R6/2 exprimiert unter dem humanen Htt-Promotor einen Teil des Exon 1 (144 Glutamine und weitere 69 Aminosäuren des ersten Exons) des humanen HD Gens, welches eine stark vergrößerte Anzahl, nämlich 144 PGW, enthält und einen fortschreitenden neurologischen Phänotyp mit vielen Ähnlichkeiten zu HD entwickelt [41]. Dieser Phänotyp beinhaltet motorische Fehlfunktionen [60], Beeinträchtigung des Unterscheidungslernens [61], abnorme synaptische Plastizität und eine beeinträchtigte räumliche Wahrnehmung [62]. Beeinträchtigung des Lernens, manifestiert durch abnorme synaptische Plastizität, beeinträchtigte räumliche Wahrnehmung [62] und Unterscheidungsfähigkeit, können bereits 3 Wochen nach der Geburt beobachtet werden [61], die Gehirngewichtsabnahme beginnt nach 4 Wochen [33] und die motorischen Fehlfunktionen treten im Alter von 5 Wochen auf [60]. In der vorliegenden Untersuchung wurde dieses R6/2 Mausmodell verwendet, da es eines der am besten charakterisierten Mausmodelle für HD ist [23, 33, 40, 41, 44, 53, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66]. Der relativ schnelle Verlauf der Erkrankung in einem Zeitraum von ungefähr 12 Wochen [41] lässt bei guter Annäherung des Verlaufs an die Erkrankung beim Menschen [41, 61, 62, 67] eine Vielzahl unterschiedlicher Experimente in einem überschaubaren Zeitraum zu, im Gegensatz zu Mausmodellen, wo das gesamte IT15 Gen in das Genom integriert wurde.

1.4.3 Expressionsveränderung auf RNA Niveau bei R6/2 Mäusen

Die Untersuchung von Veränderungen auf der RNA Ebene bei R6/2 Mäusen hat Einblicke in die Pathologie von HD gewährt. Früh im Krankheitsprozess ist der mRNA Level von spezifischen Glutamat-, Dopamine- [40], und Cannaboidrezeptoren [68], Proteinen im Dopamin Signaltransduktionspfad [69] und met-enkephalin erniedrigt. Diese Veränderungen des Transkriptionsniveaus wurden auch in Gehirnen von HD Patienten

gefunden [70, 71, 72]. Genexpressions Mikroarrays bestätigten diese Ergebnisse und zeigten, dass Gene, welche unter anderem bei G-Protein gekoppeltem Rezeptor Signalpfaden, Kalzium-Homöostase und Retinoiden Signalwegen eine Rolle spielen, nach 6 Wochen im Striatum von R6/2 Mäusen herunterreguliert waren [73] (Abb. 1).

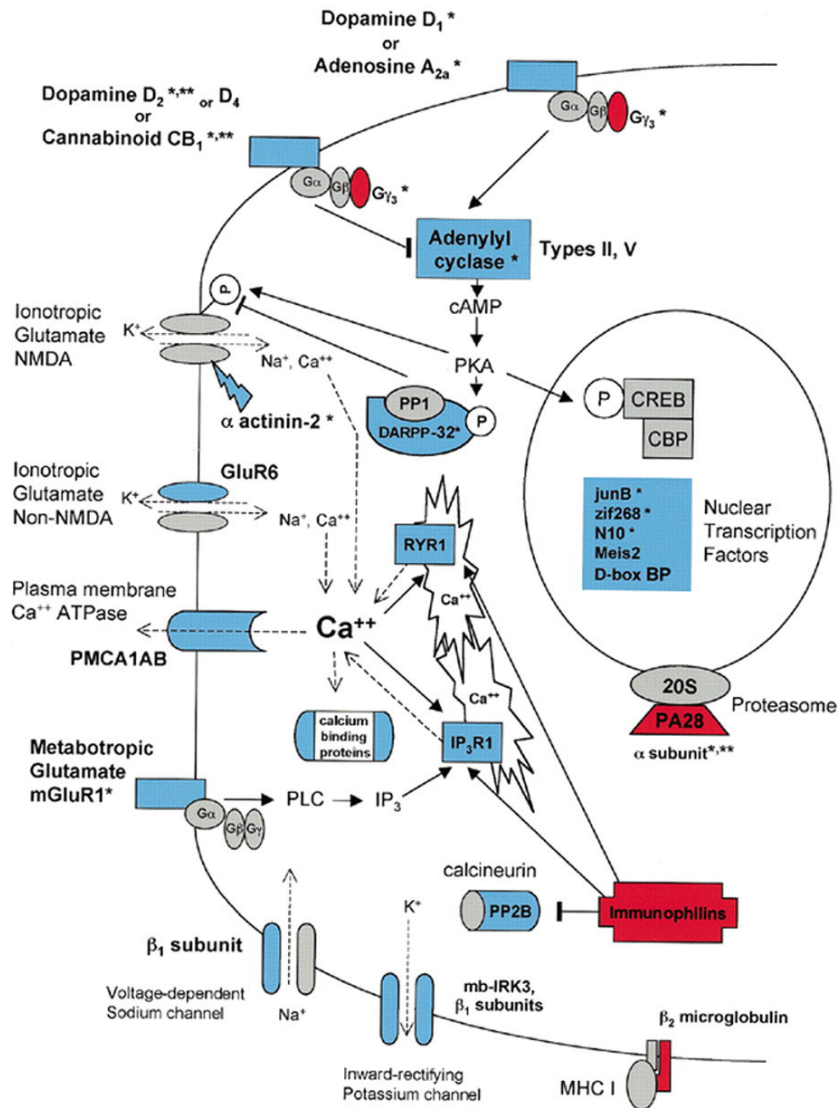


Abb. 1: Neurotransmitterrezeptoren bei HD

Die unterschiedlichen Neurotransmitterrezeptoren, deren differentielle Expression bei HD in R6/2 Mäusen eine Rolle spielen werden gezeigt. Die Abbildung ist der Veröffentlichung von Luthi-Carter et. al. entnommen (Abb. 4; [73]). Das Expressionsniveau der Produkte der differentiell exprimierten Gene in mittelgroßen, dornenförmigen Neuronen des Striatums im Vergleich zu Kontrollmäusen ist dargestellt. Die fette Schriftart symbolisiert Genprodukte, die in vier/vier Genchip-Experimenten differentiell exprimiert wurden oder deren Expression durch eine andere, unabhängige Methode bestätigt wurden (einzelner Stern). Die Farbe jedes dargestellten Elements zeigt die Richtung der Expressionsveränderung an. Rote Elemente zeigen einen Anstieg, Blaue eine Verminderung und graue Elemente eine entweder unveränderte, nicht den Auswahlkriterien entsprechende oder nicht untersuchte Expression an. Einfache Linien mit dreieckigen Pfeilen repräsentieren sequentielle Ereignisse oder positive Regulation. Stumpfe Enden entsprechen negativer Regulation. Pfeile mit unterbrochenen Linien zeigen den Fluss

von Ionen. Zweifache Sterne zeigen mRNA, die nach weniger strengen Kriterien (drei/vier Chips) differentiell exprimiert war. Für die übersichtliche Darstellung wurden nur repräsentative Mitglieder des Proteinphosphatase 1/DARPP-32 Regulationsstoffwechselweges gezeigt. Einen gründlichen Übersichtartikel zu diesem Stoffwechselweg findet man an anderer Stelle [74].

1.4.4 Veränderung bei R6/2 Mäusen auf der Proteinebene

Bei der Untersuchung der Erkrankung auf der Translationsebene zeigte sich, dass sowohl HD Patienten als auch R6/2 Mäuse intranukleäre Einschlüsse (NII) im zerebralen Kortex und dem Striatum entwickeln [13, 31, 33]. NII sind in R6/2 Mäusen bereits im Alter von 4 Wochen gegenwärtig und ihre Zahl steigt nur in geringem Umfang bis kurz vor dem Endstadium der Erkrankung (zwölf Wochen). Im Gegensatz dazu, nimmt die Anzahl der neuropilen Aggregate im Zytoplasma um das vierzehnfache während des Krankheitsverlaufes zu [22]. Aggregate könnten bei neurodegenerativen Erkrankungen vielleicht durch die Rekrutierung von Faktoren zelltoxisch wirken, die normalerweise für die Funktion, Vitalität und Struktur der Zelle wichtig sind [75, 76, 77]. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass bis jetzt schon bestimmte Komponenten des Proteasoms [78], Transkriptionsfaktoren [79, 80], Chaperone [81, 82] und Kaspasen [38] als Aggregatkomponenten identifiziert worden sind. Es wurde bereits gezeigt, dass zwei Mitglieder der Familie der kleinen Hitzeschockproteine (Hsp), die Chaperone Hsp40 und Hsp70, die Aggregation von verkürzten Polyglutaminproteinen in amyloidartige Fibrillen „in vitro“ hemmen [83]. Ein weiteres Mitglied der kleinen Hsp Familie, α B-Kristallin (ABC) ist während der reaktiven Gliose [84, 85], eine neuropathologische Eigenschaft von HD [54], hochreguliert. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von ABC, Aggregation, die durch die Überexpression des „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) in Astrozyten verursacht wird, reduziert [82]. Diese Beobachtung spricht für eine Mitwirkung von ABC in einem Mechanismus, der für die Aufrechterhaltung der Intermediärfilamentstruktur verantwortlich ist. ABC wurde auch als eine Komponenten der Plaques bei der Alzheimer Krankheit nachgewiesen [86].

1.5 Durchführung einer Proteomics Studie für HD

Einige Überlegungen zu den Eigenschaften und Möglichkeiten einer Proteomics Studie helfen bei deren korrekten Planung und Durchführung.

1.5.1 Allgemeine Grundlagen für eine Proteomics Studie

Das Proteom eines zu untersuchenden Gewebes besteht aus allen Proteinen, die in diesem Gewebe im Laufe der Zeit exprimiert werden [87]. Diese Expression ist abhängig vom Entwicklungsstadium des untersuchten Gewebes und bei Erkrankungen auch davon, ob das Gewebe krank oder gesund ist. Um Aussagen über den Zustand eines erkrankten Gewebes machen zu können, ist das Vorhandensein einer Referenz wichtig, das gesunde Gewebe. Die Beurteilung über die Durchführbarkeit einer Proteomics Studie bei Erkrankungen richtet sich aus diesem Grund am Vorhandensein der Zustände „krank“ und „gesund“ aus. Absolute Aussagen nach ausschließlicher Untersuchung des erkrankten Gewebes lassen sich nicht machen, da eine absolute Quantifizierung der Proteine in der Probe nicht möglich ist. Der Proteomics Ansatz ist somit ein vergleichender Ansatz.

1.5.2 Eingrenzung der Vielfalt bei der Proteomics Studie

Bei der Auswahl des zu untersuchenden Spezies muss man sich über die Vorteile und Limitierungen der einzelnen Spezies, vor allem im Hinblick auf die mögliche Aussagefähigkeit der durch eine Proteomics Studie zu erzielten Resultate im klaren sein. Bei der Untersuchung einer Erkrankung, z. B. HD, an Geweben vom Menschen ist eine direkte Relevanz der Ergebnisse gewährleistet. Histologische und morphologische Untersuchungen liefern aufgrund ihrer überschaubaren Komplexität gute Ergebnisse mit menschlichem Probenmaterial. Werden die Proteine aus einem Gewebe jedoch mittels Großgel 2D-Elektrophorese aufgetrennt, kann man mehrere tausend Proteinspots mit sehr unterschiedlicher Intensität auf dem 2D Gel unterscheiden. Die nach dem Vergleich von zwei Gelen auftretenden Unterschiede können verschiedenartigste Ursachen haben. Proteinpolymorphismen, z. B. durch Mutation, veränderte Struktur und posttranslationale Modifizierungen bilden eine Gruppe der möglichen Ursachen für diese Unterschiede. Physiologische, aufgrund von ablaufenden Stoffwechselvorgängen, oder methodische Unterschiede bilden zwei weitere Kategorien. Schließlich besteht noch die Möglichkeit, dass die Unterschiede ihre Ursache in der untersuchten Erkrankung haben. Vor allem durch die posttranslationale Prozessierung und Modifizierung ist die Vielfalt auf der Protein- gegenüber der RNA-Ebene um ein vielfaches höher. Beim Menschen erhöht sich die Proteinvielfalt noch durch die Heterogenität innerhalb der Spezies. Dieses Problem der

hohen Variabilität der Proteinexpression innerhalb der Spezies *Homo Sapiens*, selbst bei guter Reproduzierbarkeit der Methode, tritt bei Tiermodellen, wo häufig Inzucht die Regel ist, nicht auf, da diese ein homogenes Genom besitzen. Die Unterschiede zwischen zwei zu vergleichenden Proteomen sind meist quantitativer (Spotintensität) und nicht qualitativer (Spot ist vorhanden oder nicht) Natur. Dies ist eine Beobachtung die auch für die Heterogenität der Expression zwischen den Individuen einer Spezies gilt. Auch hier treten meist quantitative Unterschiede bei Proteinspots auf. Die Heterogenität innerhalb einer Spezies kann also krankheitsrelevante Unterschiede, durch zuvor schon existente Spotintensitätsunterschiede eines Proteins zwischen den Individuen, maskieren. Die Heterogenität innerhalb der Spezies lässt sich also durch die Verwendung eines Krankheitsmodells mit ingezüchteten Versuchstieren umgehen und die nicht gewollte Variabilität zwischen zwei untersuchten Proben kann so reduziert werden.

1.5.3 Auswahl eines geeigneten Modellsystems für HD

Ein weiterer Nachteil ist, dass Humanproben nicht im Rahmen eines Experimentes manipuliert werden können, was eine Überprüfung von komplexen Hypothesen sehr schwierig macht. Ein wichtiger Punkt war nun die Auswahl eines geeigneten Modellsystems für die Untersuchung von HD. Bei der Auswahl des Systems muss die experimentelle Fragestellung berücksichtigt werden. Bei der Untersuchung einer neurodegenerativen Erkrankung wie HD ist es wichtig, dass das Gehirn des Modelltieres dem des Menschen ziemlich nahe kommt, ohne jedoch dessen Generationszeit zu besitzen. Bei der vorliegenden Studie erwies sich die Maus als guter Kompromiss. Abb. 2 zeigt deutlich die Ähnlichkeit beider Spotmuster, in vergleichbaren Gelausschnitten, zwischen den Spezies Maus (*Mus Musculus*) und Mensch (*Homo Sapiens*). Die Mäuse können im Gegensatz zum Menschen gezielt experimentell manipuliert werden, was eine Überprüfung von aufgestellten Hypothesen vereinfacht. Ingezüchtete Mäuse weisen eine gute Reproduzierbarkeit bei Kontrolltieren und transgenen Tieren auf (Abb. 2). In der vorliegenden Studie gab es zwischen Kontrolle und erkrankter Maus selbst krankheitsspezifische Unterschiede nur in geringem Maße. Anders verhielt es sich dagegen bei einem Vergleich von Individuen des Menschen. Die Proben wiesen viele Unterschiede zwischen HD und Kontrolle auf, die nach Quervergleich von mehreren Probenpaaren unspezifisch und auf die Heterogenität innerhalb der Spezies zurückzuführen waren (Abb. 2 und Tab. 12 und 13 im Anhang). Außerdem gab es beim Menschen zwischen den

jeweiligen Kontrollen bzw. HD 2D Gelen ähnlich viele Unterschiede wie zwischen HD und Kontrolle. Eine Limitierung des Modellsystems besteht jedoch in der Tatsache, dass die Ergebnisse immer noch mit Ergebnissen aus dem humanen System untermauert werden müssen.

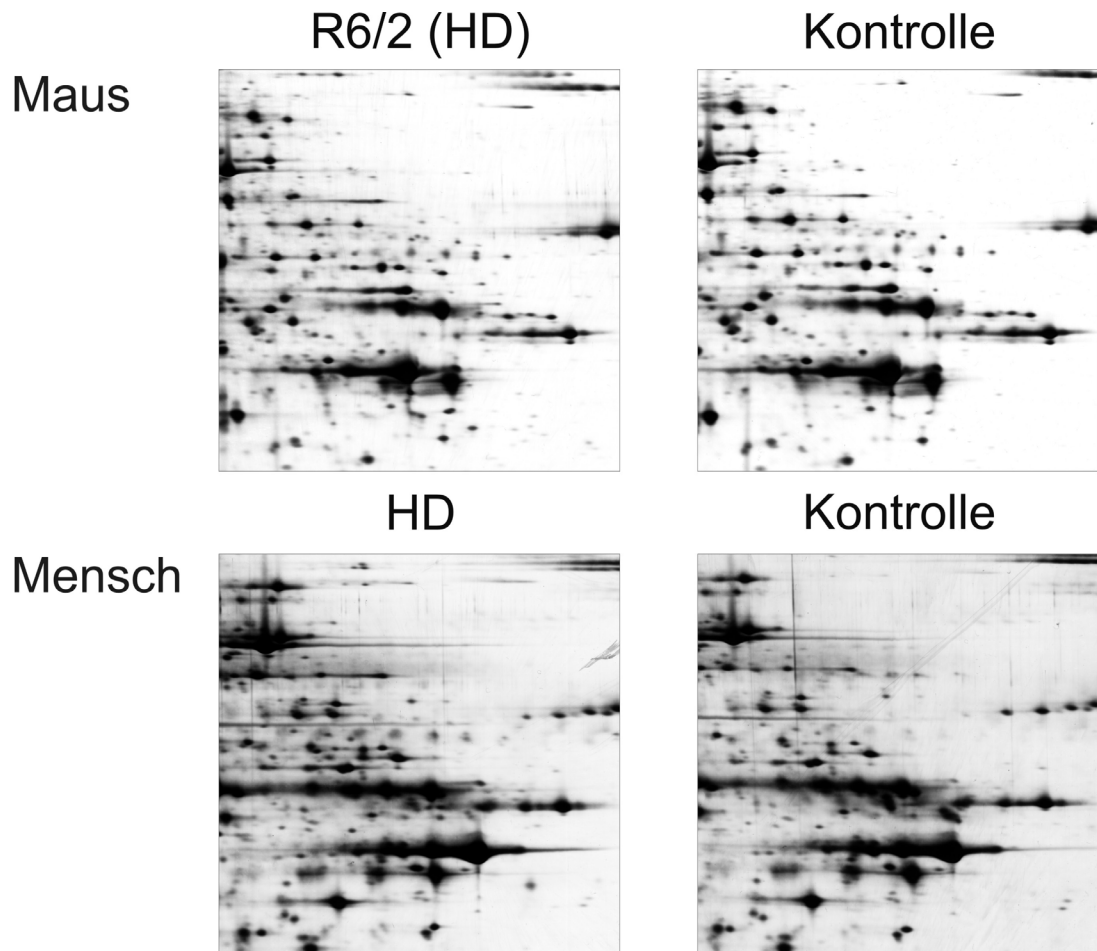


Abb. 2: Speziesübergreifende Ähnlichkeit der Spotmuster und Vergleich der Reproduzierbarkeit bei der Spezies Maus und Mensch

Ausschnitte von der Seite mit hohem pH (6 – 9,5) von 2D Gelen, eines repräsentativen Probenpaares der Spezies Mensch und Maus zeigen eine deutliche Ähnlichkeit der Musterstrukturen in den Gelausschnitten. Große Unterschiede sind zwischen HD- und Kontroll-Spots beim Menschen nicht aber bei der Maus zu sehen. Das Probenpaar bei der Maus stammt von 8 Wochen alten Mäusen. Das Probenpaar vom Menschen stammt aus dem vorderen Globus Cinguli von zwei Postmortem-Gehirnen (HD, B3703 und Kontrolle, B3700). Zum Zeitpunkt des Todes war Patient B3703, 61 und B3700, 62 Jahre alt (Tab. 7).

1.5.4 Verfügbarkeit der Proben bei Maus und Mensch

Der Zugang zu geeignetem menschlichem Gewebematerial stellt im Gegensatz zu Blut oder Urin ebenfalls ein Problem dar. Genetische Erkrankungen, wie z. B. Huntington's

Chorea sind selten, sodass die Anzahl der zur Verfügung stehenden Proben begrenzt und das Material kostbar ist. Anfragen nach Proben aus dem menschlichen Gehirn werden von Gehirnbanken nur bei Nachweis spezifischer, vielversprechender Vorstudien mit Tiermodellen berücksichtigt. Die größte Zahl der Proben ist vom Endstadium der Erkrankung erhältlich. Die Zahl der geeigneten Proben verringert sich noch dadurch, dass menschliches Gewebe oft vor dem Einfrieren lange Zeit bei 4 °C gelagert, danach mit Formalin konserviert und erst dann eingefroren wird. Die dadurch entstehenden Proteinmodifizierungen wirken sich negativ auf das Spotmuster im Gel aus. Zeitverlaufsstudien sind aufgrund der geringen Zahl der Proben aus frühen Stadien, meist von Unfallopfern mit der Erkrankung, kaum oder nicht möglich. Interessante Proben, wie z.B. bei HD aus „juvenile Onset“ Fällen, also HD Fällen von Jugendlichen und Kindern, mit schwerem Verlauf und somit auffälligen Änderungen bei der Proteinexpression sind sehr selten. Nach diesen Fällen besteht aber eine sehr große Nachfrage. Aufgrund strenger ethischer Richtlinien bedarf die Arbeit mit Humanmaterial der besonderen Genehmigung durch eine Ethikkommission der wissenschaftlichen Hochschule. Diese Genehmigung ist mit hohem Aufwand an Verwaltung und Zeit verbunden, ohne die Gewährleistung von aussagekräftigen Ergebnissen. Aufgrund der Möglichkeit zur im Prinzip unbegrenzten Nachzucht und der zeitnahen Sicherung des Probenmaterials durch sofortiges Einfrieren des Gewebes nach Entnahme aus der frisch getöteten Maus, ist eine Begrenzung des Probenmaterials bei der Maus kaum zu erwarten. Die Genehmigung von Tierversuchen ist sehr viel unproblematischer als die Anträge auf Probenakquisition beim Menschen. Die Aufzucht der Mäuse erfolgt unter für das Krankheitsmodell und die Kontrolltiere identischen, definierten Bedingungen.

1.5.5 Erkenntnisgewinn aus einer Proteomics Studie

Vor der Durchführung einer Proteomics Studie muss man sich auch über die zu erwartenden Ergebnisse im klaren sein. Nach der Untersuchung des Proteoms zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf einer Erkrankung, erhält man die zeitlich aufgelöste Expression vieler, unterschiedlicher Proteine. Untersuchung verschiedener Gewebe liefert ein Bild über die Gewebsexpression. Die Fraktionierung der Proben vor der Auftrennung im 2D Gel gibt nähere Auskunft über die mögliche Lokalisation der untersuchten Proteine in der Zelle (Zytoplasma, Membran oder Kern) [88]. Die Untersuchung des Proteoms gibt also einen ersten Anhaltspunkt über die bei der Pathogenese beteiligten Proteine und deren

Expression. Diese Untersuchung bildet die Grundlage für weitere, klassische, biochemische Untersuchungsmethoden zur Aufklärung der Funktion der als krankheitsrelevant identifizierten Proteine. Bei der Proteomics Studie handelt es sich um einen wichtigen, breit angelegten, nicht hypothesenbestimmten Ansatz um auch krankheitsrelevante Proteine zu identifizieren, die sich nicht direkt von Wechselwirkungen mit dem krankheitsverursachenden Protein ableiten lassen. Mit dieser Vorgehensweise können also neue Ansatzpunkte für bereits existierende molekularbiologische und biochemische Methoden gefunden werden.

2 Zielsetzung

HD wurde bereits in Mausmodellen [34, 41, 57] und beim Menschen [31] untersucht. Die bisher in der Literatur beschriebenen Veränderungen auf der RNA und Proteinebene, können noch nicht schlüssig die Fehlfunktionen von Neuronen erklären, die dazu führen, dass diese, aufgrund eines noch nicht bekannten Mechanismus, untergehen [23]. Deswegen müssen Proteine, die in Stoffwechselwegen außerhalb der bisher für die Erkrankung bekannten Wege wirken, noch immer identifiziert werden. Ziel dieser Arbeit ist es, diese krankheitsrelevanten Proteine durch Untersuchung des Gehirnpoteoms eines sehr gut charakterisierten Mausmodells, R6/2, zu finden [41]. Unter Verwendung der Großgel 2D-Elektrophorese soll die zytoplasmatische, die Membran- und die Kernfraktion von murinem Gehirngewebe untersucht werden. Betroffene, menschliche Gehirnregionen werden untersucht um die bei der Maus gewonnenen Resultate für die Erkrankung beim Menschen zu untermauern. Untersuchungen von weiteren Organen der Maus werden durchgeführt um ein Gewebeexpressionsmuster der zuvor beim Gehirn identifizierten Proteine zu erhalten und krankheitsbedingte Veränderungen der Proteinexpression in verschiedenen Organen zu untersuchen.

3 Ergebnisse der Dissertation im Überblick

Es wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Expression von zwei Serinproteasehemmern, α 1-Antitrypsin und Contraspin, sowie des Chaperons α B-Kristallin auf Proteinebene im Krankheitsverlauf von HD im Gehirn von R6/2 Mäusen herunterreguliert war. Nach der Untersuchung von Herz, Leber und Testes, konnte eine reduzierte Expression von α 1-

Antitrypsin und Contraspin, in R6/2 Mäusen auch in diesen drei Organen nachgewiesen werden. Eine verminderte Expression von α B-Kristallin erfolgte nur im Gehirn von R6/2 Mäusen. Die verminderte Expression der untersuchten Isoformen eines leberspezifischen Proteins (Major Urinary Protein (MUP)) und dessen verminderte Sekretion im Urin von R6/2 Mäusen ermöglicht die Verwendung dieses Proteins als Marker für den Verlauf von HD bei pharmakologischen Screens nach Wirkstoffen gegen die Erkrankung. Ein verändertes Proteinexpressionsmuster von α 1-Antitrypsin, ein Protein, welches auch in Alzheimer Plaques vorkommt, wurde auch für das Endstadium der Erkrankung beim Menschen entdeckt, was die Ergebnisse bei der Maus untermauert, und so eine wichtige Brücke zwischen dem Mausmodell und der Erkrankung beim Menschen bildet.

4 Materialien und Methoden

4.1 Tiere und Gewebe

Gewebe von 4, 8 und 12 Wochen alten, transgenen R6/2 Mäusen sowie CBA x C57Bl/6 Kontrollmausgewebe wurden in unseren Studien verwendet. Diese wurden im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Gillian P. Bates, Guy's Hospital, London, UK, aus deren Mäusezucht bereitgestellt. R6/2 Mäuse wurden durch Rückkreuzung auf (C57Bl/6 x CBA)F₁ Mäuse vermehrt. Die Genotypisierung und die Bestimmung der Länge der CAG-Wiederholungen wurde wie bereits beschrieben durchgeführt [65]. C57Bl/6 Mäuse wurden von Charles River, Deutschland, erworben. Menschliche Gehirnprouben wurden von verschiedenen Quellen erworben. Striaten und Parietallappen von einem Huntington Chorea Patienten und einer Patientin, wie auch die in Alter und Geschlecht übereinstimmenden Kontrollen, waren ein Beitrag vom Institut für Neuropathologie der „Ludwig Maximilian“ Universität München. Proben des vorderen Globus Cinguli (Brodmann Bereich 24) von Grad 4 Gehirnen [54] und die in Alter und Geschlecht übereinstimmenden Kontrollen wurden vom Harvard Brain Tissue Resource Center, MA, USA bereitgestellt (Aufstellung der Proben, Tab.7).

4.2 Gewinnung von Gehirnregionen und anderen Geweben

Mausgehirne wurden präpariert wie an anderer Stelle bereits beschrieben [88]. Mäuse wurden enthauptet, das Fell entfernt, der Schädel geöffnet und das Gehirn vollständig entnommen. Das Rückenmark wurde am Rhombenzephalon abgetrennt. Das Gehirn wurde in eine auf Eis gelagerte Petrischale, welche mit 0,9 % (w/v) Kochsalzlösung (NaCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) gefüllt war, verbracht. Am Gehirn verbliebenes Blut wurde durch vorsichtiges spülen mit der Kochsalzlösung entfernt. Das Gehirn wurde nun mit Kimwipes® (Kimwipes® Lite; Hakle-Kimberly, Mainz, Deutschland) trockengetupft, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C für den weiteren Gebrauch gelagert. Die folgenden Gehirnregionen wurden von einem Pathologen mit großer Erfahrung mit der Handhabung von Mausgehirnen von drei weiblichen, 20,5 Wochen alten, C57Bl/6 Mäusen präpariert: Nervus Trigeminus, Hypophyse, Motor Kortex (mit

Amygdala und Area Entorhinalis), Hippocampus, Bulbi Olfactorii, Cerebellum, Striatum, Frontaler Kortex, Mittelhirn, Rhombenzephalon, Thalamus (mit Hypothalamus) und das Septum. Leber, Herz und Testes wurden auf gleiche Weise präpariert wie das Gehirn. Die Leber wurde zum Entfernen des Blutes mit 0,9 % (w/v) Kochsalzlösung perfundiert.

4.3 Herstellung von Proteinproben

4.3.1 Konzept

Die Methode zur Extraktion von Proteinen wurde an anderer Stelle ausführlich beschrieben [88]. Bei der Prozedur wurden gefrorene Gewebeteile von Organen mechanisch in kleine Stücke zerkleinert und dann chemisch und enzymatisch weiter zerteilt. Maximal drei Fraktionen wurden von jeder Gewebeprobe hergestellt: die erste Fraktion enthält die pufferlöslichen Proteine (Proteine hauptsächlich aus dem Zytoplasma), die Zweite beinhaltet die Harnstoff/Detergenz (CHAPS) löslichen Proteine (Membranfraktion). Diese Fraktion beinhaltet Proteine, welche in Membranen und anderen Strukturen der Zelle und allen Organellen, eingebettet sind. Die dritte Fraktion, das Restpellet, ist eine Kernfraktion, die hauptsächlich aus Chromatin besteht. Durch DNase Behandlung werden die chromosomalen Proteine (Histone u. a.) freigesetzt. Ein wichtiges Kennzeichen dieses Verfahrens ist es, dass mit den drei Fraktionen das gesamte Spektrum von Proteinen abdeckt wurde, welches in einer Gewebeprobe vorhanden ist. Jeder selektive Verlust von Proteingruppen wurde wegen dem Fehlen von Reinigungsschritten vermieden. Die Proteinkonzentrationen in den Extrakten sind fast mit der „in vivo“ Konzentration identisch, was den Verlust von Proteinklassen durch Aggregation nahezu ausschließt. Die Komponenten, welche zu den jeweiligen Geweben während der Extraktionsprozedur zugegeben wurden, basierten immer auf dem Gewicht, womit Unterschiede in der Proteinkonzentration aufgrund von Gewebsgewichtsunterschieden zwischen R6/2 und Kontrollmäusen ausgeschlossen wurden. Eine zusätzliche Kontrolle für die gleiche Proteinkonzentration in beiden Proben ist die Tatsache, dass die meisten der Proteinspots auf R6/2- und Kontroll-2D-Gelen mit der gleichen Intensität exprimiert wurden und diese somit als interner Standard für gleiche Proteinkonzentrationen in beiden Proben dienten. Die Reproduzierbarkeit der Extraktionsprozedur wurde streng kontrolliert indem errechnete Referenzwerte mit Standardwerten verglichen wurden ([88], Seite 83 Note 4 und dort befindliche Referenzen). Durch die Fraktionierung erhöht sich die Anzahl der

durch die 2D Gelelektrophorese nachweisbaren Proteine indem diese über drei Gele verteilt wurden. Bei der Proteinextraktion diente Harnstoff als chaotrophes Agens, das Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb und zwischen den Peptidketten bei den Proteinen zerstört. Hohe Harnstoffkonzentrationen waren notwendig um eine komplette Denaturierung von Proteinen mit Disulfidbrücken zu gewährleisten. Harnstoff muss auch während der IEF vorhanden sein um zu gewährleisten, dass die Proteine nicht erneut renaturieren. Der Vorteil der Verwendung von Harnstoff ist, dass er die intrinsische Ladung der Proteine nicht beeinflusst und so die IEF nicht stört. Ein Überschuss an DTT ist sehr wichtig um die Disulfidbrücken innerhalb der Proteine zu reduzieren und somit aufzubrechen. Diese würden sonst der Denaturierung entgegenwirken und die Absättigung der Proteine mit SDS während der SDS-PAGE in der zweiten Dimension der Elektrophorese stören. Bei der Membranfraktion sorgten CHAPS und Harnstoff für das Herauslösen von Proteinen aus zellulären Strukturen. Die Benzonase-Behandlung bei der Kernfraktion setzt DNA-gebundene Proteine frei.

4.3.2 Durchführung der Proteinextraktion

4.3.2.1 Plasmatische Fraktion

Bei -80 °C eingefrorene Proben, mit einem vom Gewebe abhängigen Gewicht (bis ca. 500 mg), wurden so schnell wie möglich gewogen um die Kondensation von Wasser auf dem gefrorenen Gewebe zu vermeiden. Kondenswasser würde das Gewicht der Probe vergrößern und die auf dem Probengewicht basierenden Berechnungen zur Puffer und Inhibitorenzugabe verfälschen. Nach dem Wiegen wurden die Probe in vorgekühlten Mörser aus Halbedelstein (WITA, Berlin, Deutschland) verbracht, der sich, ungefähr zur Hälfte in flüssigem Stickstoff getaucht, in einer Styropor[®] Box befand. Probenpuffer P1 (keine Zugabe von P1 bei Gehirn und Testes zu diesem Zeitpunkt) und Proteasehemmerlösungen H1 und H2 wurden zum Gewebe zugegeben, wobei die benötigten Mengen mit Hilfe des Probengewichts bestimmt wurden (Tab. 2). P1 bestand aus 50 mM TRISMA[®] Base (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 100 mM KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 20 % (w/v) Glyzerin (Merck, Darmstadt, Deutschland). H1 bestand aus den Protease-Inhibitoren Pepstatin A (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und PMSF (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Das Ansetzen des Hemmers erfolgte in Chargen von 19 ml. Hierzu wurden 0,0048 g Pepstatin

A in 50 mL Ethanol (reinst) (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 37 °C und 0,174 g PMSF in 10 ml Ethanol (reinst) gelöst. Die beiden Lösungen wurden dann zu gleichen Teilen (9,5 ml) gemischt und in Portionen zu je 200 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert. H2 bestand aus einer Tablette Complete® (Roche, Mannheim, Deutschland), welche in 2 ml P1 gelöst wurde. Es erfolgte eine Aliquotierung zu je 100 µl und eine Lagerung bei -80 °C. Die zugegebenen Volumen wurden anhand des Probengewichtes wie in Tab. 2 beschrieben, berechnet.

Tab. 2: Zusammenfassung der Arbeitsschritte für die Proteinextraktion in verschiedenen Geweben

| Arbeitsschritt ^[a] | Gewebe | | |
|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | Gehirn ^[b] | Leber | Herz |
| Zytoplasma | | | |
| Homogenisieren 1 | | | |
| PG | 220 - 250 mg | 220 - 250 mg | 100 – 150 mg |
| P1 | | PG x 1,5 | PG x 1,0 |
| | PG | $\Sigma 1 = PG + P1^{[c]}$ | $\Sigma 1 = PG + P1$ |
| H1 | PG x 0,02 | $\Sigma 1 \times 0,02$ | $\Sigma 1 \times 0,02$ |
| H2 | PG x 0,08 | $\Sigma 1 \times 0,08$ | $\Sigma 1 \times 0,08$ |
| | $\Sigma 1 = PG + H1 + H3$ | $\Sigma 2 = \Sigma 1 + H1 + H3$ | $\Sigma 2 = \Sigma 1 + H1 + H3$ |
| Ultraschall | | | |
| Anzahl Kugeln | | $\Sigma 2 \times 0,034$ | $\Sigma 2 \times 0,034$ |
| Wiederholungen | | 6 x 10 sec | 12 x 10 sec |
| Zentrifugation 1 | | | |
| Bedingungen | TI50 Rotor, 50000 rpm, 30 min, 4°C | TI50 Rotor, 50000 rpm, 30 min, 4°C | TI50 Rotor, 50000 rpm, 30 min, 4°C |
| Überstand Ü1 | Einfrieren | Einfrieren | Einfrieren |
| Pe1 | Wiegen | Wiegen | Wiegen |
| Homogenisieren 2 | | | |
| P1 | Pe1 x 0,5 | Pe1 x 2,0 | Pe1 x 1,0 |
| | $\Sigma 2 = Pe1 + P1$ | $\Sigma 3 = Pe1 + P1$ | $\Sigma 3 = Pe1 + P1$ |
| H1 | $\Sigma 2 \times 0,02$ | $\Sigma 3 \times 0,02$ | $\Sigma 3 \times 0,02$ |
| H2 | $\Sigma 2 \times 0,08$ | $\Sigma 3 \times 0,08$ | $\Sigma 3 \times 0,08$ |
| | $\Sigma 3 = \Sigma 2 + H1 + H3$ | | |
| Ultraschall | | | |
| Anzahl Kugeln | $\Sigma 3 \times 0,034$ | | |
| Wiederholungen | 6 x 10 sec | | |
| Rühren | 4°C, 45 min | 4°C, 45 min | 4°C, 45 min |
| Zentrifugation 2 | | | |
| Bedingungen | TI50 Rotor, 50000 rpm, 30 min, 4 °C | TI50 Rotor, 50000 rpm, 30 min, 4 °C | TI50 Rotor, 50000 rpm, 30 min, 4 °C |
| Ü1 + Ü2 | Wiegen | Wiegen | Wiegen |
| Pe2 | Wiegen | Wiegen | Wiegen |
| KF A | | | |
| | (Ü1 + 2)/PG | (Ü1 + 2)/PG | (Ü1 + 2)/PG |

| | | | | |
|-------------------------|--|--|--|--|
| 1D-Lauf | | | | |
| Aliquot AI (aus Ü1 + 2) | 50 µl | 50 µl | 50 µl | |
| Ha | AI x 1,08 (= 54 mg) | AI x 1,08 (= 54 mg) | AI x 1,08 (= 54 mg) | |
| DTT | AI x 0,1 (= 5 µl) | AI x 0,1 (= 5 µl) | AI x 0,1 (= 5 µl) | |
| Servalyte 2-4 | AI x 0,1 (= 5 µl) | AI x 0,1 (= 5 µl) | AI x 0,1 (= 5 µl) | |
| Verdünnung | | 1:2 (20 µl + 20 µl) | 1:2 (20 µl + 20 µl) | |
| Auftragsmenge | 6 oder 9 µl | 6 µl | 6 µl | |
| <hr/> | | | | |
| Membran | | | | |
| <hr/> | | | | |
| P2 | Pe 3 x 1,4 | Pe 3 x 1,6 | Pe 3 x 2,2 | |
| | $\Sigma 4 = \text{Pe 3} + \text{P2}$ | $\Sigma 4 = \text{Pe 3} + \text{P2}$ | $\Sigma 4 = \text{Pe 3} + \text{P2}$ | |
| H3 | $\Sigma 4 \times 0,08$ | $\Sigma 4 \times 0,08$ | $\Sigma 4 \times 0,08$ | |
| | $\Sigma 5 = \Sigma 4 + \text{H3}$ | $\Sigma 5 = \Sigma 4 + \text{H3}$ | $\Sigma 5 = \Sigma 4 + \text{H3}$ | |
| Rühren | 4°C, 60 min | 4°C, 60 min | 4°C, 60 min | |
| Ha | $\Sigma 5 \times 0,56$ | $\Sigma 5 \times 1,08$ | $\Sigma 5 \times 0,25$ | |
| Rühren | RT, 45 min | RT, 45 min | RT, 45 min | |
| DTT | $\Sigma 5 \times 0,1$ | $\Sigma 5 \times 0,1$ | $\Sigma 5 \times 0,1$ | |
| Servalyte 2-4 | $\Sigma 5 \times 0,1$ | $\Sigma 5 \times 0,1$ | $\Sigma 5 \times 0,1$ | |
| Zentrifugation 3 | | | | |
| Bedingungen | Ti50 Rotor, 50.000 rpm, 30 min, 17 °C | Ti50 Rotor, 50.000 rpm, 30 min, 17 °C | Ti50 Rotor, 50.000 rpm, 30 min, 17 °C | |
| KF B | | | | |
| Auftragsmenge | Ü3/Pe3 10 µl | Ü3/Pe3 10 µl | Ü3/Pe3 10 µl | |
| <hr/> | | | | |
| Kern | | | | |
| <hr/> | | | | |
| P3 | Pe4 x 1,0 | Pe4 x 1,0 | Pe4 x 1,0 | |
| | $\Sigma 6 = \text{Pe3} + \text{P3}$ | $\Sigma 6 = \text{Pe3} + \text{P3}$ | $\Sigma 6 = \text{Pe3} + \text{P3}$ | |
| Ben | $\Sigma 6 \times 0,025$ | $\Sigma 6 \times 0,025$ | $\Sigma 6 \times 0,025$ | |
| Rühren | 4°C, 30 min | 4°C, 30 min | 4°C, 30 min | |
| | $\Sigma 7 = \Sigma 6 + \text{Ben}$ | $\Sigma 7 = \Sigma 6 + \text{Ben}$ | $\Sigma 7 = \Sigma 6 + \text{Ben}$ | |
| Ha | $\Sigma 7 \times 1,08$ | $\Sigma 7 \times 1,08$ | $\Sigma 7 \times 1,08$ | |
| DTT | $\Sigma 7 \times 0,1$ | $\Sigma 7 \times 0,1$ | $\Sigma 7 \times 0,1$ | |
| Rühren | RT, 30 min | RT, 30 min | RT, 30 min | |
| Servalyte 2-4 | $\Sigma 7 \times 0,1$ | $\Sigma 7 \times 0,1$ | $\Sigma 7 \times 0,1$ | |
| Summe | $\Sigma 8 = \Sigma 7 + \text{Ha} + \text{DTT}$ | $\Sigma 8 = \Sigma 7 + \text{Ha} + \text{DTT}$ | $\Sigma 8 = \Sigma 7 + \text{Ha} + \text{DTT}$ | |
| KF C | | | | |
| Auftragsmenge | $\Sigma 8/\text{Pe4}$ 10 µl | $\Sigma 8/\text{Pe4}$ 10 µl | $\Sigma 8/\text{Pe4}$ 10 µl | |

^[a]Die genaue Erklärung des Ablaufes der einzelnen Arbeitsschritte erfolgt im laufenden Text. ^[b]Testesgewebe wurde wie Gehirngewebe aufgearbeitet. ^[c]Bei Berechnungen wird immer das Gewicht der angegebenen Summe (Σ) oder Komponente, z. B. von P1 oder H1 eingesetzt. Abkürzungs- und Begriffserklärungen: Σ , Summe aus verschiedenen Komponenten; Ben, Benzonase; Ha, Harnstoff; HX, Hemmer X; Kern, durch Benzonase Behandlung (DNA-Verdau) freigesetzte Proteine; KF X, Kontrollfaktor X; Membran, Harnstoff/Detergenz (CHAPS) lösliche Proteine aus den Membranen der Zelle und der Organellen; PeX, Pellet X; PG, Probengewicht; PX, Puffer X; Zytoplasma, gepoolter erster und zweiter Überstand der zytoplasmatischen und nukleoplasmatischen Fraktion; ÜX, Überstand X.

Das Gewebe wurde nun mit einem Stößel zusammen mit P1, H1 und H2 zu einem feinen Puder zermahlen. Bei Leber und Herz wurde der Gewebepuder nun vorsichtig in ein 2 ml Eppendorfgefäß verbracht und eine genau berechnete Anzahl Glaskugeln (Tab. 2) zugegeben ($2,5 \pm 0,05$ mm Durchmesser; Worf Glaskugeln GmbH, Deutschland) und einer

Ultraschallbehandlung zugeführt. Bei Gehirn und Testes erfolgte die Ultraschallbehandlung erst nach dem zweiten Mörsern der Probe (Tab. 2). Hierzu wurde ein Ultraschallbad (Sonorex RK 31; Bandelin, Berlin, Deutschland), gefüllt mit Eiswasser, verwendet. Die Ultraschallbehandlung erfolgte jeweils für 10 s, die verbleibende Zeit bis 60 s wurde für die Probenkühlung im Eiswasser verwendet, wobei das Homogenat zum besseren Wärmetausch mit einem dünnen Platindraht gerührt wurde. Bei einer länger als 10 s dauernden Ultraschallbehandlung würde die Probe zu warm, sodass die Proteine geschädigt werden könnten. Anschließend wurde die Probe für 60 s auf Eis gelagert. In dieser Zeit wurde eine zweite Probe bearbeitet. Auf diese Weise war es möglich, immer von zwei Proben, jeweils abwechselnd, Proteine zu extrahieren. Die Zahl der Wiederholungen der Ultraschallbehandlung war stark vom Gewebe abhängig. Gewebe mit niedrigem Muskelanteil, wie z. B. Gehirn, wurden sechs mal und das mit hohem Muskelanteil (Herz), zwölf mal behandelt. Im Anschluss an die Ultraschallbehandlung wurden die Glaskugeln durch Zentrifugation entfernt. Hierzu wurde das Eppendorfgefäß mit der Probe dicht verschlossen und auf den Kopf gestellt. Anschließend wurde mit einer Nadel ein Loch, mit ca. 1,5 mm Durchmesser, an die tiefste Stelle des gewölbten Bodens gestochen. Das Eppendorfgefäß wurde nun auf ein Zweites gesteckt und bei 3500 UPM (Varifuge[®] 3,0 R; Kendro, Hanau, Deutschland) eine Minute lang zentrifugiert. Auf diese Weise erfolgte die nahezu verlustfreie Abtrennung der Glasskugeln aus dem Homogenat. Das Homogenat wurde nun im zweiten Eppendorfgefäß in flüssigen Stickstoff gefroren, wobei dieses im 45° Winkel gehalten wurde. Diese Schräglage erleichterte das Entfernen des nun gefrorenen Homogenats aus dem Gefäß durch Klopfen mit dem Griffende eines plastikverkleideten Schraubenziehers. Das Homogenat wurde in noch gefrorenem Zustand in ein Ultrazentrifugenröhrchen (16 x 76 mm, 13,5 ml; Nalgene Company, Rochester, NY, USA) verbracht und dann bei 4°C unter rühren aufgetaut und schließlich bei 226.0000 g, 30 min. bei 4°C zentrifugiert (CENTRICON T-2060; Kontron, Eching, Deutschland; Rotor: TFT 50.13; Kontron, Eching, Deutschland). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig mit einer über einem Bunsenbrenner „ausgezogenen“ Pasteurpipette entfernt und in einem NUNC[®] (1,8 ml) Röhrchen gesammelt und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren, um die vielleicht noch trotz der zugegebenen Hemmer verbliebene Restaktivität von Proteasen zu unterbinden. Das Pellet wurde ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren und gewogen. Durch Klopfen mit dem Schraubenzieher wurde das tiefgefrorene Pellet in den vorgekühlten Mörser verbracht (siehe oben) und es wurden

erneut P1 (zum ersten Mal bei Gehirn und Testes), H1 und H2, abhängig von Gewicht und bearbeitetem Gewebe, zugegeben (Tab. 2) und wie bereits beschrieben, gemörsert. Bei den Testes und beim Gehirn erfolgte erst jetzt die Ultraschallbehandlung. Bei Herz und Leber wird das nach dem Mörsern entstandene Pulver direkt in das Ultrazentrifugenröhrchen mit Mikrorührfisch (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verbracht, bei 4 °C unter Rühren aufgetaut und danach weitere 45 min. gerührt. Die zweite Zentrifugation erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Erste (Tab. 2). Nach Abnahme des Überstandes wurde dieser mit dem Ersten gepoolt und beide zusammen gewogen. Die Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Extraktionsprozedur erfolgte indem das Gewicht der beiden gepoolten Überstände durch das am Anfang eingesetzte Gewebegewicht geteilt wurde. Dieser Wert wurde mit Standartwerten aus bereits durchgeführten Proteinextraktionsprozeduren des gleichen Gewebes verglichen. (Tab. 2 und [88], Seite 83 Note 4 und dort befindliche Referenzen). Nun wurde ein Aliquot der ersten beiden Überstände mit 9 M Harnstoff (Biorad, Hercules, CA, USA), 70 mM Dithiothreitol (DTT, Biorad, Hercules, CA, USA) und 2 % (v/v) Servalyte 2,0 – 4,0 (Serva, Heidelberg, Deutschland)(Endkonzentrationen in der Probe!) versetzt. Je nach Gewebeart wurde die Probe noch verdünnt (Leber und Herz) oder nicht (Testes und Gehirn). Der Probenverdünnungspuffer bestand aus 9 M Harnstoff, 0,07 M DTT, 2% (v/v) Servalyte pH 2,0 – 4,0 und bidestilliertem Wasser. Dieser Schritt diente zur Vorbereitung des Probenauftrags auf die isoelektrische Fokussierung (IEF). Das zweite Pellet (Pe2) wurde sofort nach der zweiten Überstandsabnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert.

4.3.2.2 Membranfraktion

Das Pellet, welches bei der Extraktion der zytoplasmatischen und nukleoplasmatischen Proteine zurückblieb (Pe2), wurde mit Puffer 2 (P2), in welchem das Detergenz CHAPS gelöst war und Hemmer 3 (H3) zusammengebracht (Tab. 2) und wie in 4.3.2.1 beschrieben, gemörsert. P2 bestand aus 200 mM KCl, 20% (w/v) Glyzerin und Phosphatpuffer (ca. 33 ml 200 mM NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 67 ml 200 mM Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland) ergab pH = 7,2) mit einem Pufferendvolumen von 90 ml und einem pH von 7,1. H3 wurde wie H2, jedoch mit P2 anstatt P1, hergestellt. 77 mg CHAPS (Serva, Heidelberg, Deutschland) und 27 µl bidestilliertes Wasser wurden zu 900 µl P2 zugegeben. Die zuzugebenden Mengen von P2

mit CHAPS wurden, wie in Tab. 2 beschrieben, berechnet. Nach dem Mörsern wurde der entstandene Puder mit einem Spatel in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt wo sich bereits ein kleiner Magnetrührfisch befand. Es wurde darauf geachtet, dass kein Puder im Mörser zurückblieb. Nun wurde, nach dem Auftauen bei 4 °C, die Suspension bei dieser Temperatur 60 min. lang gerührt, um CHAPS Zeit zu geben, strukturelle Komponenten der Zelle zu zerstören und Membranproteine herauszulösen. Nun wurde Harnstoff bis zu einer Endkonzentration von 9 M zugegeben und die Suspension nochmals 45 min. bei RT gerührt, damit der Harnstoff seine chaotrope Wirkung entfalten konnte. Nach einigen Minuten, wenn der Harnstoff fast vollständig gelöst war, wurde bis auf eine Endkonzentration von 70 mM, DTT zugegeben, um Disulfidbrücken in den herausgelösten Proteinen aufzubrechen. Nach dem Rühren wurde der Magnetrührfisch möglichst ohne Probenverlust entfernt und die Suspension bei 17 °C, 30 min lang, bei 226.0000 g zentrifugiert (Tab. 2). Danach wurde der Überstand vollständig entfernt und in ein vorher beschriftetes und gewogenes NUNC[®] Röhrchen verbracht. Nun wurde der Überstand mit 2 % (v/v) Servalyte 2-4 (Endkonzentrationen in der Probe!) versetzt. Der Überstand war nun zum Auftrag auf die IEF bereit. Das Pellet wurde im Zentrifugenröhrchen eingefroren, danach aus dem Röhrchen entfernt und bei – 80 °C gelagert.

4.3.2.3 Kernfraktion

Das Pellet, welches nach der Fraktionierung der Membranproteine übriggeblieben war, wurde nun zusammen mit Puffer 3 (P3), wie unter 4.3.2.1 beschrieben, gemörsert. P3 besteht aus 50 mM TRIZMA[®]Base und 0,49 g/l MgSO₄ x 7 H₂O (Ferak, Berlin, Deutschland) in bidestilliertem Wasser. Der pH-Wert des Puffers wurde mit 1 M HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 8,0 bei Raumtemperatur korrigiert. Das benötigte P3 Volumen wurde nach Tab. 2 bestimmt. Der Puder wurde nun mit einem Spatel, ohne Materialverlust, in ein Zentrifugenröhrchen mit kleinem Rührfisch überführt. Nun wurde der Puder bei 4 °C aufgetaut, Benzonase nach Maßgabe des Herstellers (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben und 30 min. lang bei 4 °C gerührt, damit die Benzonase die DNA verdauen und so die daran assoziierten Proteine freisetzen konnte. Nun wurde Harnstoff für eine Endkonzentration von 9 M in der Probe zugegeben und die Suspension bei RT weitere 30 min. gerührt. Die sofortige Harnstoffzugabe würde die Benzonase denaturieren und ihre Aktivität inhibieren. Während des Rührens, nachdem Teile des Harnstoffs gelöst waren, wurden 70 mM Dithiothreitol (DTT) und 2 % (v/v) Servalyte 2,0 – 4,0

(Endkonzentrationen in der Probe!) zugegeben. Nun konnte die Suspension auf die IEF aufgetragen oder eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

4.3.2.4 Körperflüssigkeiten

Blutproben wurden mit Servalyte pH 2,0 - 4,0 , 9 M Harnstoff und 70 mM DTT versetzt, 1 : 4 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und danach auf die 1D Gele aufgetragen. Urinproben wurden nach der gleichen Verfahrensweise, aber unverdünnt, aufgetragen [88].

4.4 Großgel 2D-Elektrophorese

Proteine wurden durch hochauflösende, Großgel 2D-Elektrophorese aufgetrennt, eine Technik, die in unserem Labor entwickelt und erst kürzlich detailliert beschrieben wurde [89, 90]. Obwohl die „Lauf zu Lauf“-Unterschiede mit dieser Technik sehr gering sind, wurden durch zufällige Auswahl aus einem Pool von Proben von Mäusen des gleichen Gewebes, genetischen Hintergrunds, Geschlechts und Alters, Paare, bestehend aus jeweils einem R6/2 und einem Kontrollgewebe, gebildet, sogenannte Probenpaare. Beim Menschen wurde auf die Verwendung von Gewebe aus der gleichen Gehirnregion geachtet, dass sich im Alter möglichst wenig unterschied. Alle Probenpaare hatten das gleiche Geschlecht. Die genetische Heterogenität innerhalb der Spezies Mensch konnte nicht ausgeglichen werden. Probenpaare wurden nun immer parallel beiden Elektrophoreseprozeduren unterzogen. Die erste Dimension (1D), die IEF, basiert auf der „Carrier Ampholyte Technik“, bei welcher der pH-Gradient während des Laufs erzeugt wird. Die Trennstrecke betrug 40 cm. Bei der Herstellung von 2D Gelen für die Spotdetektion oder Identifikation hatten die 1D Gele einen Durchmesser von 0,9 mm oder 1,5 mm und ein Probenvolumen von 6 μl - 10 μl (Tab. 2) oder 50 μl . Nach Beendigung des 1D Laufes wurden die 1D Gele halbiert und jede Hälfte separat zusammen mit der passenden Hälfte (niedriger oder hoher pH-Bereich) des Probenpaares der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) als zweiter Dimension unterzogen. Der pI-Wert wurde, wie vor kurzem im Detail an anderer Stelle beschrieben, bestimmt [90]. Das 1D Gel (mit Probe) wurde nach dem Lauf entlang der Trennstrecke in 80, 0,5 cm lange, Stücke zerschnitten. Die Gelstücke wurden danach einzeln in 1,5 ml Eppendorfgefäßes gefüllt mit 40 μl bidestilliertem Wasser, welches durch Kochen und Vakuum entgast wurde, verbraucht. Während des gesamten Prozesses wurden die Eppendorfgefäße unter einer Stickstoffatmosphäre gehalten. Die dicht verschlossenen

Gefäße mit den Gelstückchen wurden nun 15 min. lang in Eiswasser mit Ultraschall behandelt. Der pH für jedes zweite Segment wurde mit Hilfe einer Mikro-pH-Elektrode gemessen. Der komplette Gradient wurde bestimmt indem die einzelnen Messungen in ein pH-Profil über die Trennstrecke zusammengesetzt wurden. Der pI für bekannte Proteinspots wurde nun identifiziert, indem die 1D Trennstrecken mit dem pH-Profil verglichen wurden. Diese Proteine wurden als Referenzpunkte verwendet um pI-Werte von unbekannten Spots in weiteren 2D Läufen zu bestimmen. Das Molekulargewicht wurde durch die relative Mobilität im Vergleich zu Markerproteinen in der zweiten Dimension bestimmt. Die Trenndistanz bei der 2D beträgt 28 cm. Um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen wurden, wenn möglich, identische 1D und 2D Kammern und die dazu gehörigen Spannungsgeräte für alle Läufe verwendet.

4.4.1 Die erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden Proteine nach ihrem Isoelektrischen Punkt (pI), bei dem ihre Nettoladung gleich null ist, aufgetrennt.

4.4.1.1 Reinigung der 1D Gelröhrchen

Zur Herstellung eines Gels werden zylindrische Glasröhrchen (Schott Glas, Mainz, Deutschland) mit einer durchgängigen zentralen Bohrung mit einem Innendurchmesser von 0,9 mm (analytische Gele, Spotdetektion) und 1,5 mm (präparative Gele, Spotidentifizierung) und einer Länge von 44,8 cm verwendet (Abb. 3). Grosse Sorgfalt wurde darauf verwendet, sicherzustellen, dass die Gelröhrchen vor dem Lauf absolut sauber waren, um so eine gleichmäßige Anhaftung des Gels an das Glas zu gewährleisten und um Kontaminationen durch Fremdprotein zu vermeiden. Die Reinigung erfolgte durch das Einweichen der Glasröhrchen in erhitzter (50 °C) 6 % (v/v) Deconex[®]-12-Lösung (Borer Chemie, Zuchwil, Schweiz). Danach wurden sie auf 90 °C in einer 0,1 M HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) Lösung erhitzt. Abschließend wurden die Röhrchen vorsichtig mit deionisiertem Wasser gespült und unter Verwendung von Druckluft getrocknet.

4.4.1.2 Herstellung der 1D Gele

Fünf Glasröhrchen wurden senkrecht in einen Gelröhrchenständer eingespannt und mit Nylonziehfäden (Angelschnur; Ertner super, 0,70 mm, 100 m, Deutschland), welche

absolut dicht mit den Bohrungen abschließen, versehen. Zur Herstellung der Dichtigkeit wurden die Nylonziehfäden über einer Flamme leicht angesengt und sofort durch ein 0,9 mm ID Röhrchen gezogen. Das untere Ende jedes Röhrchens wurde in eine Giesschiene gestellt. Die Nylonfäden wurden soweit nach unten gedrückt, dass sie genauso wie die Gelröhrchen an die Gießchiene anstießen. Nun wurde mit Hilfe der Fäden bidestilliertes Wasser in die Röhrchen aufgezogen. Das Trenngel und das Cappel wurden in einem auf 30 °C erhitzten Wasserbad 30 min. lang inkubiert bis der Harnstoff in beiden Gellösungen vollständig gelöst war. Danach wurden beide Gellösungen 5 min. lang mit einer Wasserstrahlpumpe entgast. Das Entgasen vermeidet die Blasenbildung während des Gelgießens und stellt eine reproduzierbare Polymerisierungsgeschwindigkeit sicher. Nun wurde das Wasser aus den Glasröhrchen entfernt, die Röhrchen durch Druckluft getrocknet und die Nylonziehfäden wieder eingesetzt und nach unten gedrückt bis sie an die Gießchiene anstoßen. Für fünf Gele mit 0,9 mm Bohrungsdurchmesser wurden 50 µl einer 0,8 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS, Biorad, Hercules, CA, USA) Lösung zu 1.950 µl des Separationsgels (Herstellung siehe Tab. 3) zugegeben und die Lösung danach sanft mit einem dünnen Glasstäbchen gerührt.

Tab. 3: Chemische Zusammensetzung des Separationsgels

| Komponente | Stammlösung | Lösung | Endkonzentration |
|-------------------------------------|-----------------|----------------------|------------------|
| Acrylamid ^[a] | 3,5 g | 10 ml | 3,5 % (w/v) |
| PDA | 0,3 g in 20 ml | | 0,3 % (w/v) |
| Carrier Ampholyt Mix ^[b] | | 5 ml | 4 % (v/v) |
| Harnstoff | | 27 g | 54 % (w/v) = 9 M |
| Glyzerin | 14,3 g in 50 ml | 8,75 ml | 5 % (w/v) |
| TEMED | 60 µl | 5 ml | 0,06 % (v/v) |
| Persulfat | 0,08 g in 10 ml | ^[b] 50 µl | 0,02 % (w/v) |

^[a]Acrylamid, PDA (Piperazine Diacrylamide), TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, N,N,N',N'-Di-(dimethylamino)ethan oder N,N,N',N'-Tetramethyl-1-,2-diaminomethane (alles Synonyme)) (Biorad, Hercules, CA, USA) Zur Herstellung der Gellösung wurde Harnstoff höchstmöglicher Reinheit verwendet; ^[b]Der Carrier Ampholyt Mix besteht aus einem Teil Servalyte pH 2,0 – 11 (Serva, Heidelberg, Deutschland), einem Teil Pharmalyte pH 3,5 – 10, 3 Teilen Pharmalyte pH 4,0 – 6,5, 2 Teilen Pharmalyte pH 5,0 bis 8,0 und einem Teil Pharmalyte pH 6,5 – 9,0 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Alle Lösungen wurden unter Verwendung von bidestilliertem Wasser hergestellt. Das Endvolumen der Gellösung betrug 48,75 ml; jedes Aliquot enthielt 1.950 µl.

^[b]Die Zugabe erfolgte zu einem 1.950 µl Aliquot des Trenngels.

Ohne große Verzögerung wurde die Lösung in die Giesschiene gefüllt. Nun wurden die Nylonfäden 40 cm nach oben gezogen. Es musste hierbei gewährleistet sein, dass die Separationsgellösung ohne Luftblasenbildung mit nach oben gezogen wurde. Anschließend wurde die Giesschiene mit der restlichen Gellösung entfernt und eine neue Schiene eingesetzt. Danach wurden 20 µl APS Lösung zu 780 µl Cappelösung zugegeben und

verrührt, sodann ohne Verzögerung in die Giesschiene gegossen. Nun wurde das Capgel unterhalb des Separationsgels 0,8 cm nach oben gezogen. Es durften unter keinen Umständen Luftblasen zwischen Trenn- und Capgel entstehen. Die Giesschiene wurde sodann entfernt und die verbliebene Gellösung am Röhrchenende vorsichtig mit Kimwipes® luftblasenfrei entfernt. Die Gellösungen im Röhrchen wurden jetzt weitere 0,5 cm nach oben gezogen, sodass ein kleiner Luftspalt am unteren Ende des Röhrchens entstand. Nun wurde das 1D Gel 25 min. zum Polymerisieren bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen bevor die Nylonfäden entfernt werden konnten. Die Gele wurden mindestens 3 Tage, besser 5 Tage im voraus hergestellt um ihnen genug Zeit zu geben vor dem 1D Lauf vollständig auszupolymerisieren. Um eine Dehydrierung der Gele während dieser Zeit zu verhindern, wurde eine Tropfen bidestilliertes Wasser in jede der beiden Öffnungen eines Röhrchens gegeben und danach die Enden dicht mit Parafilm M® (Pechiney Plastic Packaging, Neenah, WI, USA) verschlossen. Die chemischen Zusammensetzungen des Separations- und Capgels werden in Tab. 3 und 4 gezeigt. Bei 1D Röhrchen mit 1,5 mm Durchmesser wurden für 4 Röhrchen die doppelten Mengen an Separations- und Capgel wie für die fünf 0,9 mm 1D Röhrchen eingesetzt.

Tab. 4: Chemische Zusammensetzung des Capgels

| Komponente | Stammlösung | Lösung | Endkonzentration |
|-------------------------------------|------------------|----------------------|------------------|
| Acrylamid | 6,0 g | 4,4 ml | 12 % (w/v) |
| PDA | 0,065 g in 10 ml | | 0,13 % (w/v) |
| ^[a] Carrier Ampholyt Mix | | 2,2 ml | 4 % (v/v) |
| Harnstoff | | 11,88 g | 54 % (w/v) = 9 M |
| Glyzerin | 14,3 g in 50 ml | 3,85 ml | 5 % (w/v) |
| TEMED | 60 µl | 2,2 ml | 0,06 % (v/v) |
| Persulfat | 0,08 g in 10 ml | ^[b] 20 µl | 0,02 % (w/v) |

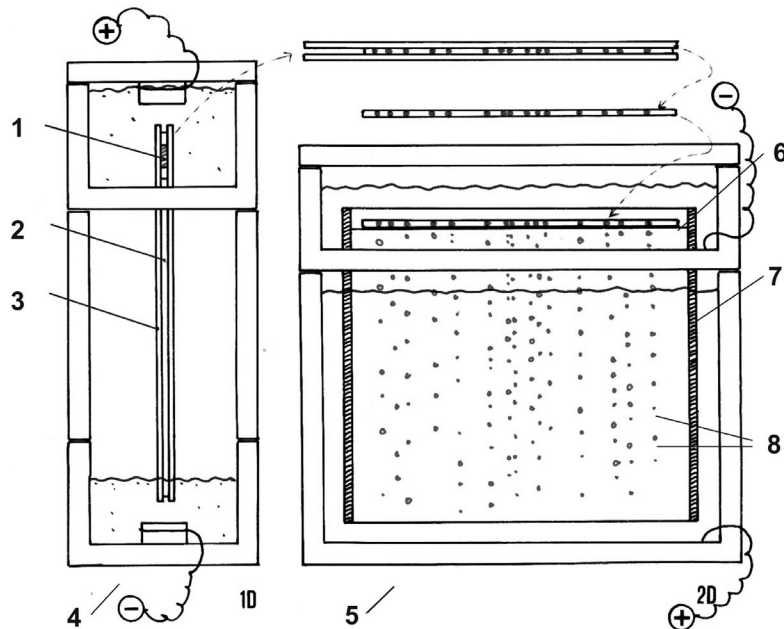
^[a]Die Komponenten des Carrier Ampholyt Mixes sind in der Legende zu Tab. 3 genau beschrieben. Alle Lösungen wurden unter Verwendung von bidestilliertem Wasser hergestellt. Das Endvolumen der Gellösung betrug 21,45 ml; jedes Aliquot enthielt 780 µl. ^[b]Die Zugabe erfolgte zu einem 780 µl Aliquot des Capgels.

4.4.1.3 Probenauftrag und IEF Lauf

Für die erste Dimension der Elektrophorese wurden meist fünf Gelröhrchen in die IEF Elektrophoresekammer (Wita, Berlin, Deutschland) mit dem Capgel nach unten eingespannt (Abb. 3A, 1D Kammer). Hierbei dienten vier der Aufnahme der Proben für zwei Probenpaare (2 HD und 2 Kontrollen) und das fünfte Röhrchen diente als Ersatz für den eventuell fehlgeschlagen Probenauftrag in einem der anderen Röhrchen. Die Gelröhrchen wurden durch eine Gummidichtung frei beweglich in Bohrungen gehalten, die

sich im Boden der oberen Kammer (Anodenkammer) befinden. Es wird so vermieden, dass diese durch zu starres Einspannen brechen oder am Boden der 1D Kammer anstoßen. Die nicht verwendeten Löcher (insgesamt acht, deswegen meist drei) wurden mit passenden

A



B

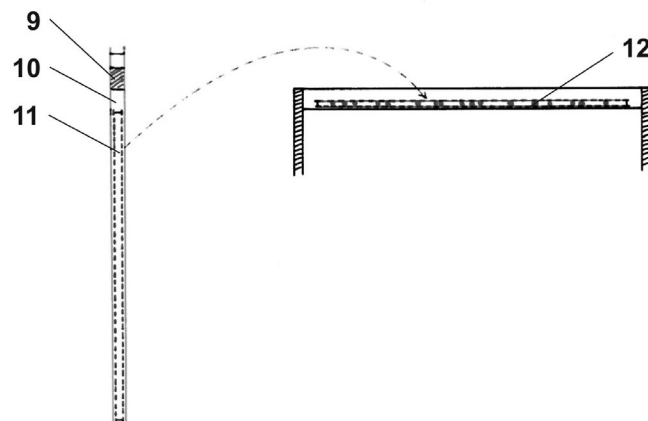


Abb. 3: Großgel 2D Elektrophorese: Erste und zweite Dimension

A: Schema der 1D und 2D Kammer mit den IEF und SDS PAGE Gelen, gezeigt während des jeweiligen Laufs: 1. Probe auf IEF Gel; 2. IEF Gel; 3. Glasröhrchen für die 1D; 4. Kammer für die erste Dimension (IEF); 5. Kammer für die 2D (SDS-PAGE); 6. IEF Gel aus der ersten Dimension auf dem SDS-PAGE Gel der 2D; 7. Spacer der zweiten Dimension (0,75 mm oder 1,0 mm dick); 8. Jeweils 2 Gele pro 2D Kammer. B: Auflegen von IEF Gel auf SDS-PAGE Gel: 9. Probe; 10. Sephadexschuttschicht; 11. IEF Gel; 12. IEF Gel liegt auf SDS PAGE Gel auf. Die Plastikklammern, welche die SDS-PAGE Gele zusammenhalten werden in A + B nicht gezeigt.

Glasstopfen verschlossen. Die untere Kammer (Kathodenkammer) wurde mit 400 ml Ethylendiaminlösung (5 % (v/v) Ethylendiamine (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn,

Deutschland), 9 M Harnstoff (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 5 % (w/v) Glycerin in bidestilliertem Wasser) befüllt (Abb. 3A, 1D Kammer unten). Im Gegensatz zu den IEF Gellösungen wurde für die Laufpuffer, aufgrund der großen verwendeten Mengen, Harnstoff einer geringeren, aber immer noch sehr hohen, Reinheit verwendet. Die Ethylendiaminlösung wurde auch dazu verwendet, die 0,5 cm langen Aussparungen vor dem Cappel in den 1D Röhrchen luftblasenfrei zu befüllen (Abb. 3A, 1D Kammer Röhrchen unten). Nun wurden die Röhrchen in die Lösung eingetaucht. Ein zwischen die Anoden- und Kathodenkammer eingesetzter, röhrenförmiger Abstandhalter gewährleistete eine konstante Entfernung zwischen diesen (Abb. 3A). Anschließend wurde das obere Ende der Gelröhrchen mit sehr schmalen ($< 0,9$ mm breit) Filterpapierstreifen trockengetupft. Eine nun aufgetragene, ca. 2 mm breite Sephadexlage (Abb. 3B, Schicht unterhalb der Proteinprobe (9)), bildete eine Schutzschicht für das nun trockene 1D Gel. Die zähflüssige Masse enthielt Sephadex-G-200 Superfine (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland), welches in bidestilliertem Wasser fünf Stunden lang bei 90 °C quellen gelassen wurde. Dann wurde mit einer Lösung aus 25 % (w/v) Glycerin gewaschen und das Sephadex schließlich mit 9 M Harnstoff, 70 mM DTT und 2 % (v/v) Carrier-Ampholyt Mix (Zusammensetzung siehe Tab. 3 Legende) vermischt (Alle drei Komponenten wurden im darunterliegenden Trenngel in gleicher Konzentration verwendet). Die Sephadexschicht diente zum Auffangen von Proteinen, die zu Beginn des Laufs präzipitieren oder aggregieren könnten, also zu einem Zeitpunkt, an dem sich diese hochkonzentriert am Anodenende des Gels befanden, und diente somit zur Vermeidung der Verstopfung der Geloberfläche. Die Proteinproben wurden oberhalb der Sephadexschicht mit Hilfe von Hamilton®-Spritzen (10 μ l; Hamilton, Bonaduz, Schweiz) appliziert (Abb. 3B (9)). Die aufgetragene Probenmenge war stark vom Gewebe und vom Durchmesser des Gelröhrchens (0,9 mm, Tab.2; 1,5 mm, 50 μ l) abhängig. Um die Proben vor der Präzipitation durch den sauren, Anodenpuffer zu schützen, wurden die Proben mit einer ca. 0,5 cm dicken Schicht Schutzlösung versehen (Abb. 3B, Raum oberhalb der Probe (9)). Zur Herstellung der Schutzlösung dienten 6 g Harnstoff und 1 g Glycerin, welche in 19 ml bidestilliertem Wasser gelöst wurden. Von dieser Lösung wurden 7,6 ml mit 0,4 ml Servalyte, pH 2,0 – 4,0 gemischt und die nun fertige Schutzlösung in 50 μ l Portionen aliquotiert und bei – 80 °C bis zum Gebrauch gelagert. Die restlichen 2,7 cm des 1D Röhrchens wurden jetzt luftblasenfrei mit oberem Anodenpuffer befüllt. Dieser besteht aus 7,27 % (v/v) Phosphorsäure (ortho-Phosphorsäure 85 %; Merck, Darmstadt, Deutschland)

und 3 M Harnstoff in bidestilliertem Wasser. Das benötigte Volumen betrug 500 ml. Mit dem restlichen Laufpuffer wurde nun die Anodenkammer befüllt (Abb. 3A; 1D, oberste Kammer). Das Verbinden der oberen Kammer mit der Anode und der unteren Kammer mit der Kathode des Spannungsgerät startete die IEF. Das Spannungsgerät (EPS 3500XL; Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurde auf eine schrittweise, stufenförmige Spannungszunahme programmiert bis zu einer Gesamtfokussierungszeit bei RT von 25 h und 40 min. . Die Elektrophoresebedingungen setzten sich im Einzelnen wie folgt zusammen: 1 h bei 100 V, 1 h bei 300 V, 23 h bei 1.000V, 30 min. bei 1.500 V und 10 min. bei 2.000 V. Mit den Stromstärke- und Leistungsregulatoren des Spannungsgeräts wurden die Maximalwerte von 10 mA bzw. 10 W festgelegt. Zur Vorbereitung auf die Äquilibration des IEF Gels nach dem Lauf, wurde der Äquilibrationpuffer bei 30 °C 30 min. lang aufgetaut und auf acht Petrischalen (100 mm x 20 mm; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) (20 ml/Schale) kurz vor dem Abbruch des IEF Laufes verteilt. Der Äquilibrationpuffer enthält 125 mM TRIZMA[®]Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 40 % (w/v) Glyzerin, 3 % (w/v) SDS (99 % Reinheit; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 5 % (w/v) DTT. Nach der Elektrophorese wurde die Gellänge abgemessen und die halbe Gellänge auf den Röhrchen vermerkt. Die Markierung erfolgte gegenüber dem Ende, von dem das Gel mit einer dicht abschließenden Nylonschnur in die vorbereiteten Petrischalen ausgestoßen wurde. Sobald die Nylonschnur an der Markierung angekommen war, wurde das Gel am Röhrchenende mit einer scharfen Pinzette abgeschnitten. Abhängig davon, ob von der kathodischen oder anodischen Seite ausgestoßen wurde, war dies entweder die saure (pH 3,5 – 6,0) oder basische Seite (pH 6,0 – 9,5) des Gels. Die im Röhrchen verbleibende Seite wurde in die nächste Petrischale ausgestoßen. Die Gele wurden genau 10 min. (0,9 mm Bohrungsdurchmesser im Röhrchen) oder 15 min. (1,5 mm Bohrungsdurchmesser im 1D Röhrchen) unter sanftem Schütteln inkubiert. Eine längere Inkubationszeit hätte unweigerlich zu einem Verlust von immer mehr Protein aus dem 1D Gel geführt, besonders von Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht. Die wichtigste Funktion der Äquilibration ist, so viel wie möglich proteinassoziierten Harnstoff durch SDS zu ersetzen. Die angegebenen Inkubationszeiten sind empirisch gefundene, gute Kompromisse zwischen diesen beiden gegenläufigen Anforderungen. Exakt nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Gelhälften in eine Glaspipette mit 0,9 mm bzw. 1,5 mm aufgesaugt und in die Vertiefungen von Gelvorratsleisten gelegt. Die Gele wurden nun mindestens über Nacht bei – 80 °C gelagert.

4.4.2 Die zweite Dimension: Großgel SDS-PAGE

Bei der Großgel SDS-PAGE wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Masse der Proteine in der Probe wurde mit Hilfe von Markerproteinen bekannten Molekulargewichts bestimmt, welche zusammen mit der eigentlichen Probe aufgetrennt wurden.

4.4.2.1 Gießen der Separationsgele

Wie bei den IEF-Gelen wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die für die Gelkammern verwendeten Glasplatten in sehr sauberem Zustand waren, um eine gute Anhaftung des Gels auf der gesamten Glasoberfläche zu gewährleisten. Vor dem Gebrauch wurden die Glasplatten sorgfältig mit destilliertem Wasser gespült und mit in 70 % (v/v) Ethanol (Herbata-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) getauchten Kimwipes® abgerieben. Die 2D Gele wurden einen Tag vor ihrem Gebrauch bereitgestellt. Die Standardgröße der Gele betrug 28 cm (Trennlänge) x 23,2 cm (Breite) x 0,75 mm (Geldicke für analytische Gele). Eine Geldicke von 1,0 mm wurde nur für präparative Gele zur Spotidentifizierung mit Hilfe der Massenspektrometrie verwendet. Zwei Behälter mit Gellösung (je 67,5 ml für 0,75 mm Plastikabstandhalter; Zusammensetzung siehe Tab. 5) wurden 30 min. lang bei 40 °C in einem Wasserbad aufgetaut. In der Zwischenzeit wurden die Kammern für die 2D zusammengebaut. Die Gießform bestand aus zwei zuvor gereinigten Glasplatten und zwei Plastikabstandhaltern (Abb. 3A (7)). Die Abstandhalter sorgten dafür, dass die Glasplatten in einem festgelegten Abstand voneinander gehalten wurden. Sie mussten über ihre gesamte Länge gleichmäßig dick sein, damit sie guten Kontakt zu den Glasplatten hatten und die entstehenden Gele gleichmäßig dick waren. Die Abstandhalter waren 0,9 cm breit und 30 cm lang. Die breite Seite wurde vor dem Zusammenbau mit einer geringen Menge Silikonpaste (GE Bayer Silicones, Baysilone Paste; Bayer, Leverkusen, Deutschland) dünn bestrichen um die Dichtigkeit der Gelkammer zu gewährleisten. Die Glasplatten wurden mit Plastikklammern aus einem Stück zusammengehalten, welche an den Längsseiten (Trennstrecke) der Gelkammer angebracht wurden. Das untere Ende der Gießform wurde durch die Verwendung eines Systems verschlossen, welches die Gießform gegen eine Gummidichtung auf einem Gießständer presst. Es wurde nun mit einer Wasserwaage sichergestellt, dass der Gießständer waagrecht aufgestellt war, damit die Gele eine Auftragsfläche, die rechtwinklig zur Trennstrecke verläuft, besitzen würden. Zu 67,5 ml Gellösung wurden 4,5 ml einer 1,28 % (w/v) APS Lösung zugegeben und beide

Komponenten unter leichtem Schwenken gut gemixt. Danach wurde die Gellösung, möglichst ohne Luftblasenbildung, zügig von oben in die Gießform gegossen. Kleine Luftblasen, welche so gut wie immer entstehen, wurden mit Hilfe eines langen, dünnen Edelstahlrahtes entfernt. Ohne große Verzögerung erfolgte eine Unterschichtung des Gels mit 1,2 ml (analytische Gele) oder 2,4 ml (präparative Gele) einer 40 % (w/v) Glycerinlösung. Dies wurde vorsichtig ausgeführt um einer Vermischung mit der Gellösung zu vermeiden. Bei einer Vermischung würde eine nicht klar definierte Grenzschicht mit geringerer Acrylamidkonzentration entstehen, wodurch die Trennschärfe an dieser Stelle vermindert werden würde. Der durch die Unterschichtung entstehende Spalt dient später als Auftragungsort für das 1D Gel (Abb. 3). Zwei 2D Gele wurden pro Gießständer gegossen. Nach einer Polymerisationszeit von 25 min. wurde die Gelzelle auf den Kopf gestellt. Das Glycerin wurde abgeschüttet und die Geloberfläche mit Spüllösung (375 mM TRIZMA[®]Hydrochlorid, 0,1 % (w/v) SDS) gereinigt und überschichtet. Nun wurde der ca. 0,5 cm hohe Spalt mit Parafilm M[®] versiegelt und die Gele 1 h bei RT polymerisiert. Nach nochmaliger Spülung und Überschichtung der Geloberfläche erfolgte eine Abdichtung mit Parafilm M[®] und eine Lagerung im Gießständer über Nacht bei 4°C zur weiteren Polymerisation.

Tab. 5: Chemische Zusammensetzung von SDS-PAGE Gelen

| Komponente | Stammlösung | Lösung | Endkonzentration |
|----------------------------------|---------------------|----------|------------------|
| Acrylamid 4x | 498 g + | | 15 % (w/v) |
| Bisacrylamid ^[a] | 6,64 g in 1.660 ml | 1.660 ml | 0,2 % (w/v) |
| TEMED | 960 µl + | | 0,03 % (v/v) |
| SDS | 3,2 g + | | 0,1 % (w/v) |
| TRIZMA [®] Base | 110,408 g + | | 375 mM |
| TRIZMA [®] Hydrochlorid | 45,44 g in 1.400 ml | 1.400 ml | 375 mM |
| Persulfat | 6,4 g in 500 ml | 4,5 ml | 0,08 % (w/v) |

^[a] Acrylamid 4x und Bisacrylamid (Serva, Heidelberg, Deutschland). Aliquots von 67,5 ml wurden aus der hergestellten Gellösung abgefüllt und bei -20 °C gelagert. Kurz vor dem Gießen des SDS Gels wurden 4,5 ml der Persulfatlösung zugegeben um die Gelpolymerisation zu starten. Für die Herstellung aller Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Das Endvolumen der Gellösung betrug 3.000 ml. Vor dem Aliquotieren wurde die fertige Lösung 1 h mit dem Ionenaustauscher Amberlite[®] IRN-150 (18 g/l; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) behandelt, um unvernetzte Acrylamidmonomere zu entfernen.

4.4.2.2 SDS-PAGE Lauf

Elf Liter Elektrophoresepuffer wurden frisch hergestellt und in das untere Pufferreservoir (die Anodenkammer) der 2D Gelelektrophorese Einheit gefüllt (Abb. 3A) und auf 15 °C vorgekühlt. Der Puffer enthielt 25 mM TRIZMA[®]Base, 192 mM Glyzine (Serva

Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) und 0,1 % (w/v) SDS in vollentionisiertem Wasser. Der gemessene pH Wert beträgt im allgemeinen 8,7 bei 16 °C und 8,55 bei 29 °C (RT während des Laufs). Um den pH-Wert konstant bei 8,7 zu halten, war eine Kühlung also unbedingt erforderlich. Für die obere Kathodenkammer (Abb. 3A; 2D obere Kammer) wurden 1,5 l eines Puffers der gleichen Zusammensetzung, jedoch mit bidestilliertem Wasser hergestellt und mit 500 µl Bromphenolblau marker gemischt (50 mg Bromphenolblau (Biorad, Hercules, CA, USA) in 150 ml bidestilliertem Wasser gelöst). Da dieser Puffer durch das SDS-PAGE Gel wandert ist hier besonders auf Reinheit der Komponenten zu achten. Die während des Laufs im Gel entstehende Bromphenolblaubande befand sich kurz hinter der Laufront und diente zur Bestimmung des Endpunktes des Laufs. Die Oberflächen der beiden SDS-PAGE Gele wurden zur Vorbereitung für den Lauf von der Spüllösung befreit und nochmals mit Spüllösung gereinigt. Anschließend wurde die Spüllösung vollständig entfernt. Das SDS-PAGE Gel war nun bereit, das IEF Gel aus der ersten Dimension aufzunehmen. Zwei IEF Gelhälften (saure Seite HD und Kontrolle bzw. basische Seite HD und Kontrolle) wurden aus der Tiefkühltruhe (- 80 °C) genommen und von der Lagerungsschiene auf je ein SDS-PAGE Gel zwischen die Glasplatten transferiert (Abb. 3A oben und B). Hierbei wurde mit dem Auftragen des Gels von einer Seite begonnen und das IEF Gel nach und nach mit Hilfe eines gebogenen Drahts vorsichtig und luftblasenfrei auf SDS-PAGE Gel gelegt. Luftblasen verhindern den Transfer der Proteine vom IEF in das SDS-PAGE Gel. Der Transfer geschah ohne dass das 1D Gel dabei gestaucht oder gestreckt wurde. Nun wurden die Gele mit Agaroselösung luftblasenfrei überschichtet (125 mM TRIZMA[®]Hydrochlorid; 0,1 % (w/v) SDS; 1% (w/v) Agarose (Biorad, Hercules, CA, Deutschland)) um ein „Aufschwimmen“ der 1D Gele während der Pufferzugabe in die obere Kammer zu verhindern. Jedes Probenpaar wurde zusammen an einem Tag bearbeitet, sodass zwei Laufkammern, bestehend aus je zwei Gelen, die zusammen in die Kammer (Desaphor VA300, Desaga, Deutschland) getaucht wurden, benutzt wurden. Nun wurde der obere Laufpuffer in die Kathodenkammer (Abb. 3A; obere Kammer der 2D) gegossen. Es wurde sichergestellt, dass eine luftblasenfreie Verbindung zwischen der das IEF Gel bedeckenden Agaroseschicht und dem Kathodenpuffer bestand. Die 2D Kammer wurde nun mit dem Spannungsgerät verbunden (EPS 3500XL, Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) und die Anfangsstromstärke auf 65 mA für analytische 1D Gele mit 0,9 mm Innendurchmesser (130 mA für präparative 1D Gele mit 1,5 mm Innendurchmesser)

festgelegt. Nach 15 Minuten wurde die Stromstärke in einem Schritt stufenförmig auf 95 mA (150 mA für präparative Gele) verstärkt und für den Rest der Laufzeit konstant gehalten. Die anfängliche, niedrigere Stromstärke diente zum vorsichtigen Transfer der Proteine vom IEF- in das SDS-PAGE-Gel. Die Puffertemperatur wurde während des Laufs konstant auf ungefähr 15 °C gehalten. Nachdem die Bromphenolblaubande eine Markierung erreicht hatte, welche sich 2 cm oberhalb der unteren Kante der Glasplatten der 2D Gele befand, wurde der Lauf abgebrochen. Sofort nach dem Lauf wurden die Gele aus der Kammer entfernt, indem die Klammern abgenommen und die Glasplatten mit einem halbkeilförmigen Spatel auseinandergedrückt wurden. Die Diffusion von Proteinen im Gel, welche die Trennschärfe der Spots negativ beeinflussen würde, setzte sich nach Abbruch des Laufes fort, sodass die Proteine sofort nach dem Lauf fixiert werden mussten. Die Fixierung der analytischen Gele zur Silberfärbung verlief über Nacht in 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) und bidestilliertem Wasser. Präparative Gele wurden über den gleichen Zeitraum in 50 % (v/v) Methanol (J. T. Baker, Deventer, Holland) und 2 % (v/v) Phosphorsäure fixiert. Für eine Gelhälfte wurde ein Liter Fixierer verwendet. Jeweils 2 Gele wurden in einer Plastikwanne fixiert. Die Fixierung immobilisiert im günstigsten Fall die Proteine, sie sorgte jedoch zumindest dafür, dass deren Diffusion im Gel zu einem sehr großen Teil reduziert wurde. Die Glasplatten wurden vom randständigen Silikon mit 100 % (v/v) Ethanol befreit und danach mit Scheuermilch (Rilan; Henkel Ecolab; Düsseldorf, Deutschland) abgerieben um die Gelreste zu entfernen. Nun wurden die Platten mit deionisiertem Wasser gespült. Zur Regeneration wurden die Glasplatten in 0,2 % (w/v) NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland) untergetaucht. Am nächsten Tag erfolgte eine erneute Reinigung der Platten mit Scheuersand. Nach dem Spülen mit deionisiertem Wasser trockneten die Glasplatten in einem geeigneten Ständer und waren bereit für den nächsten Lauf. Die Abstandhalter wurden mit Kimwipes® abgewischt und mit 96 % (v/v) Ethanol vom restlichen Silikon befreit.

4.5 Anfärbung der Proteine

Um Proteine in SDS-PAGE Gelen anzufärben wurden zwei verschiedene Färbemethoden verwendet, eine saure Silberfärbung und die Anfärbung mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250. Für die Sichtbarmachung möglichst vieler Proteine im Gel wurde die Silberfärbung verwendet, da diese Methode die höchste Empfindlichkeit zum

Proteinnachweis besitzt, die für diese Art der Anwendung zur Verfügung steht. Dieser Vorteil wiegt die mangelnde Linearität der Färbung und die proteinidentifizierungshemmende Quervernetzung der Proteine durch Glutaraldehyd bei weitem auf. Gele zur Proteinidentifikation mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbt.

4.5.1 Saure Silberfärbung zur Spoterkennung

Proteinspots wurden durch saure Silberfärbung zur Beurteilung der differentiellen Expression sichtbar gemacht. Diese Methode ist ausführlich und detailliert an anderer Stelle beschrieben worden und wurde in dieser Arbeit leicht modifiziert durchgeführt [89, 91, 92]. Nach der Fixierung über Nacht waren Substanzen, die die Färbung negativ beeinflussen könnten, wie z. B. SDS oder Glyzine, weitgehend entfernt worden. Alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden mit Gelen ausgeführt, die sich horizontal liegend einzeln in Plastikwannen befanden. Für eine hohe Effizienz aller Schritte war die schnelle und gute Benetzung der Gele mit den Färbelösungen notwendig. Aus diesem Grund wurden die Färbewannen auf einen sich mit hoher Geschwindigkeit bewegenden Schüttler positioniert. Es war darauf zu achten, dass das Gel nicht an die Färbewanne ankleben würde, da dieses sonst durch das Schütteln beschädigt werden könnte. Der schnelle Wechsel der Lösungen wurde durch Wannentausch der Gele gewährleistet. Die 2D Gele wurden aus dem Fixierer genommen und einzeln in einem Liter Inkubationslösung pro Gelhälfte und Wanne für eine Stunde quellen gelassen. Die Inkubationslösung bestand aus 30 % (v/v) Ethanol, 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd (Glutaraldehydlösung 25 %, Darmstadt, Deutschland), 4,1 % (w/v) Natriumazetat (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Die Gele wurden anschließend zweimal 20 min. lang in 2 l bidestilliertem Wasser pro Gel gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation in 1 l Silbernitratlösung (0,1 % (w/v) Silbernitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,01 % (v/v) Formaldehyd (Formaldehydlösung min. 37 % Merck, Darmstadt, Deutschland)) für 30 min. Anschließend wurden die Gele kurz mit 1 l bidestilliertem Wasser gewaschen und danach 45 s in 1 l Vorentwickler (2,5 % (w/v) Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt, Deutschland)) entwickelt. Die eigentliche Entwicklung erfolgte in 2,5 % (w/v) Natriumcarbonat und 0,01 (w/v) Formaldehyd. Die gesamte Entwicklungszeit war stark von der Menge an aufgetragenem Protein und dem verwendeten Gewebe abhängig. Der Färbeprozess wurde durch die Zugabe von Stopplösung

(0,05 M Titriplex[®] III (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,02 % (w/v) Thimerosal (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) beendet. Es konnten so bei einer Färbung zwischen vier und sechs Gelhälften gefärbt werden. Im verwendeten Silberfärbungsprotokoll wurde Glutaraldehyd verwendet, welches die Proteine unumkehrbar quervernetzt. Aus diesem Grund kann diese Methode nicht für die Proteinidentifikation mit Hilfe der Massenspektrometrie verwendet werden.

4.5.2 Coomassie Brilliant Blue G250 Färbung zur Spotidentifizierung

Zur Spotidentifizierung wurde eine Färbung unter Verwendung von Coomassie Brilliant Blue (Brillant Blau G250, Roth, Karlsruhe, Deutschland)) benützt, welche für die Verwendung zusammen mit Massenspektrometrie bereits gut etabliert, jedoch weniger empfindlich ist als die saure Silberfärbung. Die Färbung wurde leicht modifiziert nach einem bereits publizierten Protokoll durchgeführt [93, 94]. Die Gele wurden 30 Minuten lang in 1 l bidestilliertem Wasser pro Gel und Wanne gewaschen. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Jeweils zwei Gele wurden nun in zwei Litern 34 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Phosphorsäure und 17 % (w/v) Ammoniumsulfat (Merck, Darmstadt, Deutschland) in einer Stahlwanne inkubiert. Nach 1 Stunde wurden 0,66 g/l Coomassie Brilliant Blue G250 zugegeben. Die Gele wurden 5 Tage lang unter kräftigem Schütteln bei Raumtemperatur gefärbt. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Gele einzeln mindestens drei Mal in bidestilliertem Wasser gewaschen um überschüssige Coomassie Farbpartikel und Methanol zu entfernen. Danach wurden die Gele einzeln in Plastikfolie verschweißt und bei 4 °C aufbewahrt oder sofort weiterverarbeitet. Für eine gute Identifizierbarkeit der Spots war es sehr wichtig, diese möglichst schnell auszustechen und bei –80 °C zu konservieren. Aus diesem Grunde erfolgte das Ausstechen mit dem Skalpell, wenn möglich am gleichen, spätestens aber am nächsten Tag nach der Beendigung der Färbung. Die Gelstücke hatten einen Durchmesser von ca. 1,5 mm. Beim Ausstechen war darauf zu achten, dass möglichst dunkel angefärbte Partien des Spots mit hoher Proteinkonzentration ausgewählt wurden.

4.6 Trocknung der 2D Gele

Zur Konservierung der Ergebnisse der analytischen 2D Läufe wurden die silbergefärbten Gele getrocknet. Zu diesem Zweck wurde das silbergefärbte Gel flach auf eine

Zellophanfolie (Alba-Einmachhaut, Gehring & Neidweiser GmbH & Co KG, Bielefeld, Deutschland) gelegt, welche zuvor über Nacht in deionisiertem Wasser eingeweicht worden war. Diese wiederum befand sich auf 10 Lagen gut gewässertem Filterpapier (Blotting Papier, 580 mm x 580 mm; Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) und dieses lag luftblasenfrei auf einer gelochten Metallplatte. Das Gel wurde nun noch mit Zellophanfolie bedeckt. Das Filterpapier wurde so zurechtgeschnitten, dass ein mindestens 5 mm breiter Rand gegenüber den Kanten der gelochten Metallplatte frei blieb. Die Folie wurde so zurechtgeschnitten, dass sie mit dem Filterpapier abschloss. Es wurden nun noch verbliebene Luftblasen zwischen allen beschriebenen Schichten mit einem 5 cm breiten halbkeilförmigen Spachtel aus Kunststoff durch Glätten entfernt, sodass das Gel luftblasenfrei zwischen den Folien auf dem Filterpapier lag und überschüssiges Wasser entfernt wurde. Nun wurde das Gel in einen zu diesem Zweck veränderten Trockenschrank (Memmert-Wärmeschrank UL 60; Th. Karow GmbH, Berlin, Deutschland) eingesetzt und mit einer 1 mm dicken Silikonmatte luftdicht abgedeckt, sodass sich ein Vakuum ausbilden konnte. Eine angeschlossene Vakuumpumpe (Jet-1 Automatic; Genser Scientific Instruments, Rothenburg, Deutschland) entfernte das noch verbliebene Wasser und die ca. zweistündige Trocknung bei ca. 80 °C lieferte trockene Gele, welche beschriftet und in großen C3 Umschlägen aufbewahrt wurden. Die Trocknung erfolgte genau solange bis die Gele zwar trocken nicht aber spröde und rissig waren.

4.7 Spoterkennung

Die silbergefärbten 2D Gele wurden visuell bewertet, indem die beiden Gelhälften eines Probenpaares auf einem Leuchtkasten (BIOTEC-FISCHER, Reiskirchen, Deutschland) miteinander verglichen wurden. Veränderungen der Spots wurden anhand folgender Gesichtspunkte in Betracht gezogen: vorhanden/nicht vorhanden, quantitative Veränderung oder Mobilitätsveränderung; die Mobilitätsvariante definiert einen Spot oder Spots, die sich im Gel an eine andere Position „bewegen“ und damit einen Shift des Isoelektrischen Punktes und/oder des Molekulargewichts anzeigen [95].

Durchführung der massenspektrometrischen Arbeiten

Alle massenspektrometrischen Proteinbestimmungen und die dafür notwendigen in den Punkten 4.8 bis 4.11 beschriebenen Arbeiten, wurden von Herrn Dipl. Biochemiker Daniel C. Chamrad, PROT@GEN AG, Emil-Figge-Str. 76 A, 44227 Dortmund, durchgeführt.

4.8 In-Gel Verdau

Die interessanten Proteinspots wurden herausgeschnitten und abwechselnd dreimal mit 10 µl Verdaupuffer (10 mM NH_4HCO_3 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)) und 10 µl modifiziertem Verdaupuffer (10 mM NH_4HCO_3 / Azetonitril (Merck, Darmstadt, Deutschland) 1 : 1) gewaschen. Danach wurden die Gelstücke in 10 µl Azetonitril geschrumpft und in 2 µl Proteaselösung (0,05 µg/ml Trypsin; Promega, Madison, WI, USA) quellen gelassen. Der Verdau fand in einem Zeitraum von 10 bis 12 Stunden bei 37 °C statt. Der gewonnene Überstand wurde in eine saubere Quarzküvette überführt und die Gelstücke wurden noch zwei Mal mit je 5 µl Verdaupuffer extrahiert. Die Überstände wurden gepoolt. Eine von zwei verschiedenen Methoden wurde für die MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) Target Präparation verwendet. Bei der ersten Methode handelt es sich um die konventionelle, „trockene Tropfen“ Technik, mit der Aufkonzentrierung der Probe mit Hilfe von Poros 10 R1 Beads (Perseptive BioSystems, Cambridge, England) [96]. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels, wurden die Proben mit den Poros Beads in 1 µl Matrixlösung (HCCA (α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure; Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) in Azetonitril / 0,1 % (v/v) TFA 1:1 v/v) aufgenommen und auf ein konventionelles MALDI Target transferiert. Eine weitere Probenaufbereitungsmethode verwendet die AnchorChip[®] Technologie. AnchorChips[®] (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) sind mit hydrophilen Patches („Anker“) in einer hydrophoben Umgebung ausgestattet, sodass der relativ hydrophile Analyt sich auf den „Ankern“ konzentriert. Ein ein µl Tropfen des gepoolten Überstands wurde auf jeden „Anker“ (386/Target) mit 400 µm Durchmesser appliziert. Nachdem die Tropfen auf die Größe des „Ankers“ geschrumpft waren, wurden 0,5 µl HCCA (0,2 g/l Azetonitril/0,1 % (v/v) TFA (Trifluoressigsäure; Merck, Darmstadt, Deutschland) 1 : 1) zugegeben.

4.9 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zur Analyse und Identifikation der tryptischen Peptide wurde MALDI-TOF Massenspektrometrie [97] mit einem Bruker Reflex III Massenspektrometer (Bruker-Daltonik, Bremen, Deutschland) mit einer SCOUT 384 Ionenquelle verwendet. Die Beschleunigungsspannung betrug 25 kV und die Reflektorspannung wurde anfänglich auf 21.6 kV festgesetzt. Die interne Kalibrierung basierte auf tryptischen Peptiden (842,510 Da; 2211.105 Da). „Post Source Decay“ (PSD) Spektren wurde mit einer „Parent“-Ionen

Auswahl von ± 30 Da erhalten. Die Reflektionsspannung wurde in 14 Schritten von 21 kV auf 0,65 kV reduziert. Das Zusammenfügen der 14 Einzelspektren basierte auf einer Kalibrierung mit Peptiden aus dem Adrenocorticotrophen Hormon (ACTH). Die Spektren wurden manuell gelabelt. Die Datenaufnahme erfolgte mit einem Sun Ultra Computer unter Zuhilfenahme der XACQ Software, Version 4.0. Die Nachbearbeitung der Daten erfolgte mit Hilfe der XMASS Software.

4.10 Datenbanksuche auf Grundlage der Peptidmassenfingerabdruck-Spektren

Die Peptidmassenfingerabdruck-Spektren wurden unter Zuhilfenahme der nicht-redundanten NCBI Proteindatenbank mit Hilfe von ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>, V 4.8.2) analysiert [98].

4.11 Automatische Interpretation der Fragmentationenspektren:

Zur automatischen Interpretation der Fragmentationenspektren wurde der SEQUEST Algorithmus [99, 100, 101] Version 2 während des Screenens der NCBI Datenbank verwendet.

5 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Erkrankung HD wurde das Proteom von Gehirn, Herz, Leber und Testes des Htt Exon 1 transgenen Mausmodells R6/2 und von Kontroll-Mäusen gleichen Geschlechts, Alters und genetischem Hintergrund mit Hilfe der Großgel 2D-Elektrophorese verglichen. Je nach Gewebe wurden vier, acht oder zwölf Gelpaare mit jeweils mehreren tausend Proteinspots pro Gel für jeden untersuchten Zeitpunkt ausgewertet. Die genaue Anzahl der Spots pro 2D-Muster unterschied sich zwischen den verschiedenen Geweben (Leber ca. 9.000, Gehirn ca. 8.000, Herz ca. 5.000 und Testes ca. 10.000). Zur Frage der Relevanz der Ergebnisse für den Menschen wurde das Proteom von drei Gehirnregionen beim Menschen, mit jeweils ca. 4.000 bis 5.000 Spots pro Gel, ausgewertet. Es wurden nur Spotunterschiede berücksichtigt, die in allen Gelpaaren eines untersuchten Zeitpunktes identisch waren oder, bei Ergebnissen mit menschlichem Probenmaterial, wo Abweichungen von diesem Kriterium anhand von zusätzlich erhobenen Daten geklärt werden konnten. Die Auswertung der Proteinmuster führte zum Nachweis von vier verschiedenen Proteinen aus drei Proteinfamilien, die in der HD-Maus abweichend von der Kontrolle exprimiert waren. Beim Menschen konnte die differentielle Expression eines Proteins im Falle der Krankheit bestätigt werden.

5.1 Untersuchung des Gehirnproteoms bei der Maus und beim Menschen

Nach Auswertung des Gehirnproteoms bei der Maus stellte sich heraus, dass erstaunlicherweise nur eine geringe Anzahl von Proteinen zwischen R6/2 und Kontrolle differentiell exprimiert wurden. Die Spotmuster waren bei den Probenpaaren selbst nahe dem Endstadium der Erkrankung kaum unterscheidbar. Nach Auswertung aller Proteinspots zeigten sich krankheitsrelevante, signifikante Unterschiede im Expressionslevel von nur drei Proteinen, wobei der Expressionsunterschied eines der Proteine nicht immer deutlich zu sehen war. Die Lokalisation der Proteinspots im 2D Gel, die Identifizierung und subzelluläre Verteilung sowie die Expression der Proteine im Verlauf der Erkrankung wird im folgenden beschrieben und die Frage geklärt, inwieweit die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind.

5.1.1 Differentielle Proteinexpression nahe dem Endstadium der Erkrankung im Gehirn bei der Maus

Zu Beginn der Studie wurde nach krankheitsspezifischen Unterschieden im Gehirnproteom nahe dem Endstadium der Erkrankung (zwölf Wochen) bei transgenen R6/2 Mäusen gesucht, einem Stadium der Erkrankung, bei dem die größten Unterschiede zwischen erkranktem und gesundem Gehirngewebe zu erwarten waren. Wie aus den Abbildungen 4 bis 11 zu ersehen ist, waren die Spotmuster im Mausgehirn sehr reproduzierbar. Um trotzdem vorhandene, leichte Variationen fast ganz auszuschließen, wurden nur 2D Gele von Probenpaaren miteinander verglichen, die sowohl in der ersten als auch in der zweiten Dimension parallel gelaufen waren.

5.1.1.1 R6/2 Mausgehirne zeigen keine Expression von α 1-Antitrypsin 1-5 nahe dem Endstadium der Erkrankung

Drei verschiedene Fraktionen des Gehirns, mit Proteinen angereichert aus dem Zytoplasma, den Membranen oder dem Chromatin, wurden von zwölf Wochen alten R6/2- und Kontrollmäusen untersucht. Die Fraktionierung und separate Auftrennung der Proteinfractionen im 2D Gel ermöglichte die Darstellung und Untersuchung einer größeren Anzahl von Proteinen, als dies bei der Untersuchung eines Gesamtextraktes möglich gewesen wäre. Die für die einzelnen Fraktionen erzielten Ergebnisse werden nun im Einzelnen dargestellt.

5.1.1.1.1 α 1-Antitrypsin1-5 ist in der zytoplasmatischen Fraktion von R6/2 Mäusen nicht mehr nachweisbar

Im pH-Bereich von 3,5 bis 6 fehlten den R6/2 2D Gelen eine drei Spots umfassende Gruppe in allen acht untersuchten HD/Kontrolle Probenpaaren (Abb. 4, Tab. 6). Ein vierter Spot in der Nachbarschaft der Dreiergruppe fehlt im Endstadium der Erkrankung ebenfalls. Alle drei Proteinspots der Spotgruppe auf der sauren Seite wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert und gehören zu einer von fünf murinen Isoform des Serin-Protease-Inhibitors (SERPIN) α 1-Antitrypsin, nämlich α 1-Antitrypsin 1-5 (AAT 1-5) (Datenbankeintragung: alpha-1-antitrypsin 1-5 precursor; Swiss Prot. No.: Q00898). Der vierte Proteinspot war schwer zu identifizieren, da er selbst eine geringe Intensität besitzt und sehr nah bei einem anderen Spot mit höherer Intensität liegt (Abb. 4). Der beobachtete Isoelektrische Punkt von 5,3 für AAT 1-5 stimmt gut mit dem berechneten Isoelektrischen

Punkt von 5,4 überein. Das beobachtete Molekulargewicht von 61 kDa unterscheidet sich um 15 kDa von dem Berechneten (46 kDa).

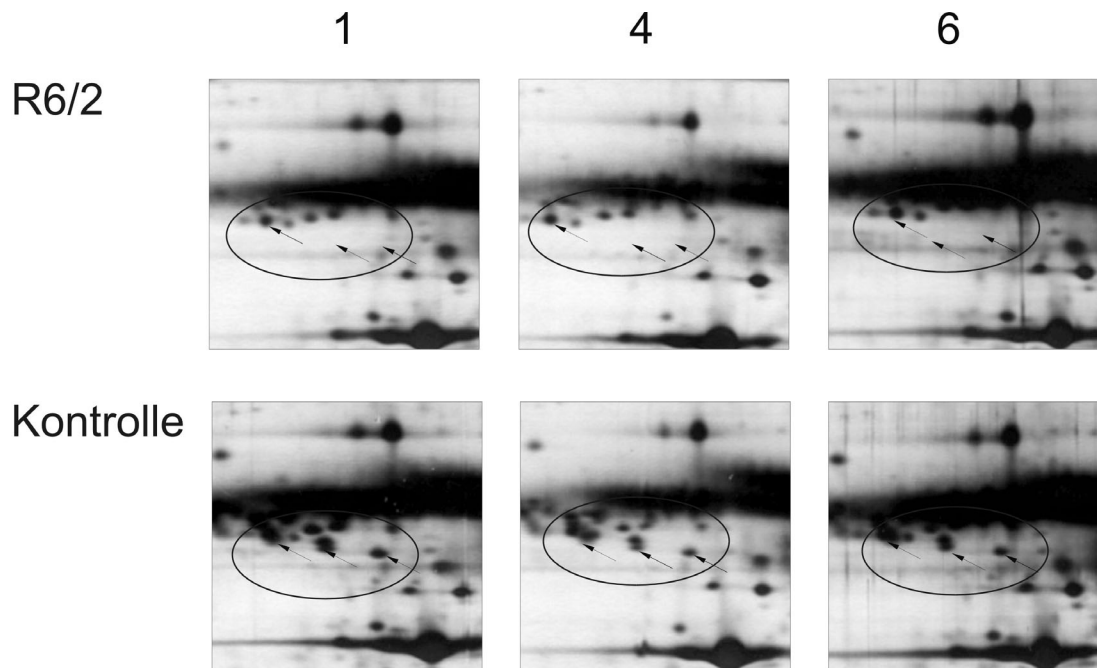


Abb. 4: AAT 1-5 Expression im Gehirn bei R6/2 Mäusen nahe dem Endstadium der Erkrankung in der zytoplasmatischen/nukleoplasmatischen Fraktion.

Gelausschnitte von drei repräsentativen Probenpaaren (1, 4 und 6) von Mäusen im Alter von 12 Wochen werden gezeigt (Tab. 6). Drei Beispiele, welche zeigen, dass drei AAT 1-5 Spots in transgenen Mäusen nicht mehr nachweisbar sind.

5.1.1.1.2 $\alpha 1$ -Antitrypsin in Membran- und Kernfraktion

Zusätzlich zur zytoplasmatischen Fraktion des Gehirns, wurden zwei weitere Fraktionen untersucht. Proteine, die durch Harnstoff und Detergenzextraktion (Fraktion 2) gewonnen wurden bildeten die Fraktion mit angereicherten Membranproteinen. DNA-bindende Proteine wurden durch DNase Behandlung freigesetzt (Fraktion 3) und bildeten die Kernfraktion. Die Unterschiede in der Verteilung der Proteine zwischen den Fraktionen ist in Abb. 23 im Anhang dargestellt. In beiden Proteinfractionen konnten keine weiteren Proteine gefunden werden, die sich zwischen R6/2 und Kontrollprobenpaaren unterschieden. AAT 1-5 konnte im Gegensatz zur zytoplasmatischen Fraktion (Abb. 4) in der Membranfraktion von Kontrollmäusen nur noch in geringen Mengen nachgewiesen werden, was entweder auf teilweise Membranassoziation oder auf geringfügige Überlappung der Proteinverteilung mit der zytoplasmatischen Fraktion zurückzuführen ist

(Abb. 5). Das Protein war in der Kernfraktion bei Kontrollen nur noch in Spuren und bei R6/2 überhaupt nicht nachweisbar, was für eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation des Proteins spricht (Abb. 6).

Tab. 6: Expression von AAT 1-5 und ABC im Verlauf der Erkrankung

| Tiere ^[a] | R6/2 | | Kontrollen | |
|----------------------|---------|-----|------------|-----|
| | AAT 1-5 | ABC | AAT 1-5 | ABC |
| 4 Wo. | | | | |
| 1 | ++ | + | - | + |
| 2 | ++ | + | + | + |
| 3 | ++ | + | +++ | + |
| 4 | ++ | + | + | + |
| 5 | + | + | + | + |
| 6 | + | + | + | + |
| 7 | + | + | - | + |
| 8 | + | + | + | + |
| 9 | + | + | + | + |
| 10 | + | + | ++ | + |
| 11 | - | + | + | + |
| 12 | - | + | - | + |
| 8 Wo. | | | | |
| 1 | ++ | + | +++ | ++ |
| 2 | + | + | ++ | ++ |
| 3 | + | + | +++ | ++ |
| 4 | + | + | ++ | ++ |
| 5 | + | + | +++ | ++ |
| 6 | - | + | ++ | ++ |
| 7 | - | + | ++ | ++ |
| 8 | - | + | +++ | ++ |
| 12 Wo. | | | | |
| 1 | - | + | +++ | +++ |
| 2 | - | + | +++ | +++ |
| 3 | - | + | +++ | +++ |
| 4 | - | + | +++ | +++ |
| 5 | - | + | +++ | +++ |
| 6 | - | + | +++ | +++ |
| 7 | - | + | +++ | +++ |
| 8 | - | + | +++ | +++ |

Erklärung der Symbole: +++ = Spot ist vorhanden (Spotintensität von Kontrollmäusen im Alter von 12 Wochen); ++ = Spot ist vorhanden, aber die Intensität ist vermindert; + = Spot ist vorhanden, aber die Intensität ist stark vermindert; - = Spot ist nicht nachweisbar; ^[a]Die Probenpaare (R6/2 and Kontrolltiere) sind so angeordnet, dass mit dem höchsten AAT 1-5 Expressionsniveau bei R6/2 Mäusen in der Tabelle begonnen wird.

5.1.1.2 Verminderte Expression von Contraspin im Gehirn von R6/2 Mäusen

Eine in der pH-Region von 3,5 bis 6 identifizierte Spotgruppe (siehe 5.2.2) mit einem Molekulargewicht von 70 kDa, welche dem Protein Contraspin zugeordnet werden konnte, zeigte eine im großen und ganzen verminderte Expression in der zytoplasmatischen Fraktion des Gehirns. Der Grad der Expressionsverminderung in R6/2 Gehirnen war jedoch auch nahe dem Endstadium der Erkrankung zwischen den Probenpaaren heterogen

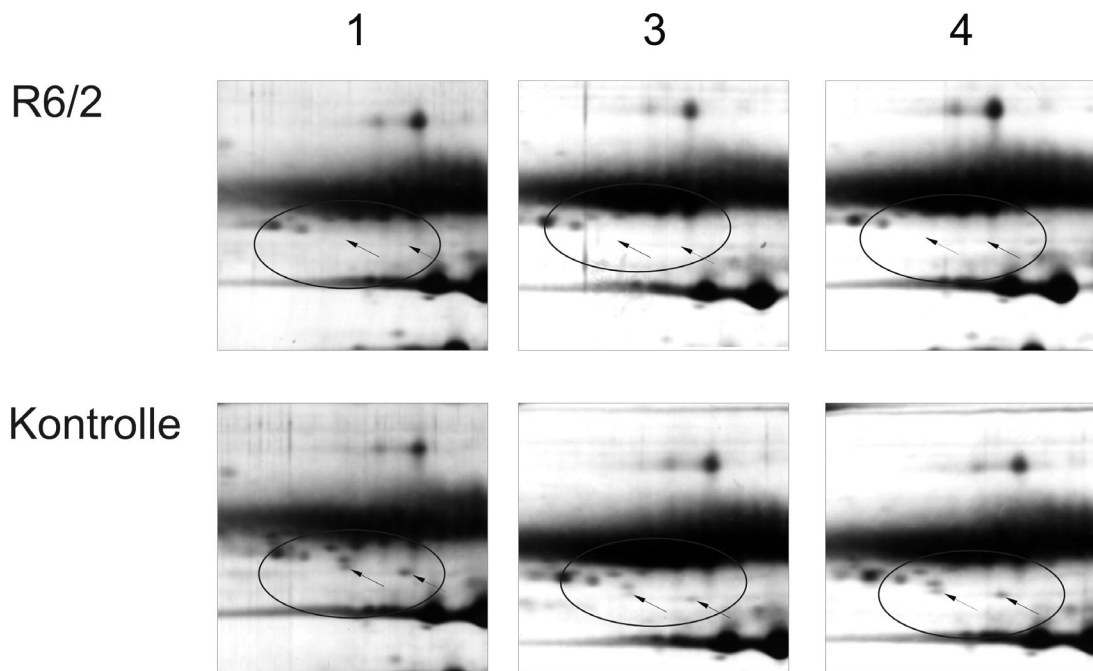


Abb. 5: Expression von AAT1-5 in der Membranfraktion nahe dem Endstadium der Erkrankung.

Gelausschnitte von drei repräsentativen Probenpaaren (1, 3 und 4) zeigen eine schwache Expression von AAT 1-5 bei 12 Wochen alten Kontroll-Mäusen.

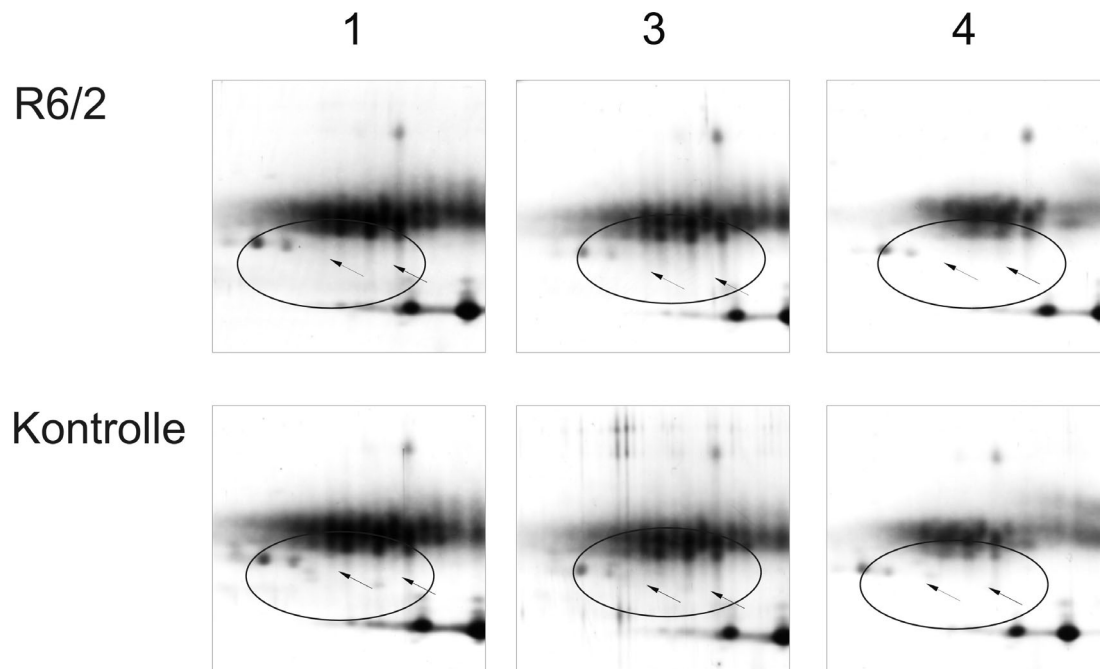


Abb. 6: Expression von AAT 1-5 in der Kernfraktion nahe dem Endstadium der Erkrankung.

Gelausschnitte von drei repräsentativen Probenpaaren (1, 3 und 4) zeigen keine Expression von AAT 1-5 in R6/2- und Kontrollmäusen im Alter von 12 Wochen. Geringste Menge an AAT 1-5 in den Kontrollen der Probenpaare sind in den Gelausschnitten nicht zu sehen.

und trat nicht immer auf (Tab.9A). Eine Expression des Proteins in der Membran- und Kernfraktion war nicht zu beobachten (Daten werden nicht gezeigt).

5.1.1.3 R6/2 Mausgehirne nahe dem Endstadium der Erkrankung zeigen eine reduzierte Expression von α B-Kristallin

5.1.1.3.1 Verminderte Expression von α B-Kristallin in der zytoplasmatischen/nukleoplasmatischen Fraktion

In der pH-Region von 6 bis 9,5 war ein quantitativer Unterschied in der Expression bei einem Spot in allen acht Probenpaaren zu sehen (Abb. 7, Tab. 6). Der Spot wurde dem Protein α B-Kristallin (ABC) mittels Massenspektrometrie zugeordnet (Datenbankeintragung: α B-crystallin; Swiss Prot. Nr.: P23927). Das Molekulargewicht von ungefähr 23 kDa, welches für ABC bestimmt wurde, unterscheidet sich um 2,5 kDa vom berechneten Wert von 20,5 kDa. Der isoelektrische Punkt wurde mit Hilfe des Gels auf 7,5 bestimmt. Dies ist ein Unterschied von 0,6 pH-Einheiten zum berechneten Wert. Beide zuvor genannten Veränderungen könnten darauf hindeuten, dass eine Modifikation des Proteins stattgefunden hat.

5.1.1.3.2 Geringere Expression von ABC nahe dem Endstadium der Erkrankung bei R6/2 Mäusen auch in der Membran- und Kernfraktion

ABC wurde auch in der Kern- und Membranfraktion gefunden. Die Expression in beiden Fraktionen nahm gegenüber der zytoplasmatischen Fraktion nicht ab. Die Expression von ABC bei R6/2 Mäusen war wie in der zytoplasmatischen Fraktion geringer als bei Kontrollmäusen. (Abb. 8 und 9).

5.1.2 Expression von AAT 1-5 und ABC während des Krankheitsverlaufes bei der Maus

Die Expression von AAT 1-5 und ABC in der zytoplasmatischen Fraktion von drei ausgewählten Krankheitsstadien, früh (vier Wochen), fortgeschritten (acht Wochen) und nahe dem Endstadium (zwölf Wochen) wurden nun untersucht um einen Überblick über die Expression im Krankheitsverlauf zu erhalten.

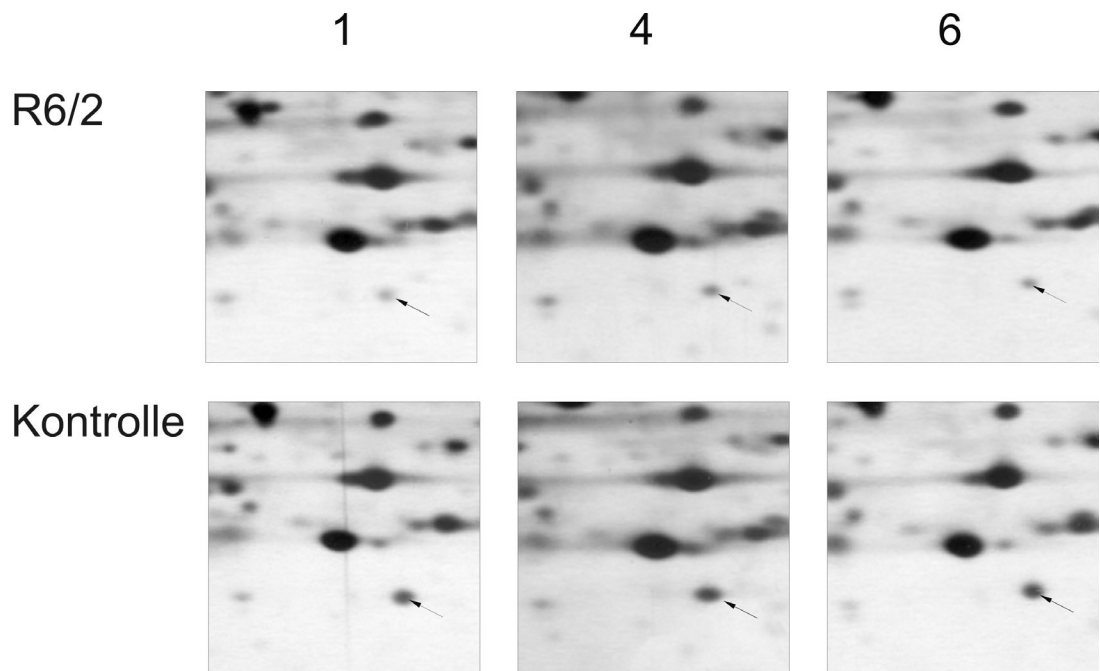


Abb. 7: Expression von ABC im Gehirn von R6/2 Mäusen nahe dem Endstadium der Erkrankung in der zytoplasmatischen/nukleoplasmatischen Fraktion.

Gelausschnitte aus dem pH-Bereich von 6 bis 9,5 zeigen eine Zunahme der Expression in drei repräsentativen Probenpaaren (1, 4 und 6) nur in Kontrollmäusen.

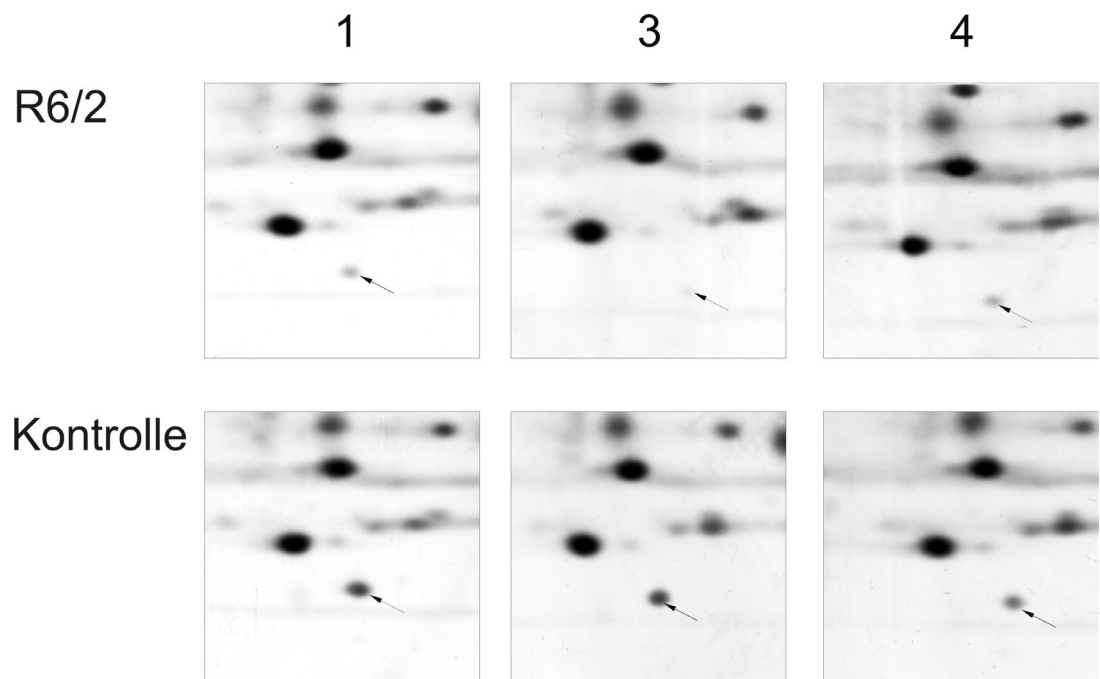


Abb. 8: ABC Expression in der Membranfraktion nahe dem Endstadium der Erkrankung.

Gelausschnitte von drei repräsentativen Probenpaaren (1, 3 und 4) zeigen eine verringerte Expression von ABC in der Membranfraktion von 12 Wochen alten R6/2 Mäusen.

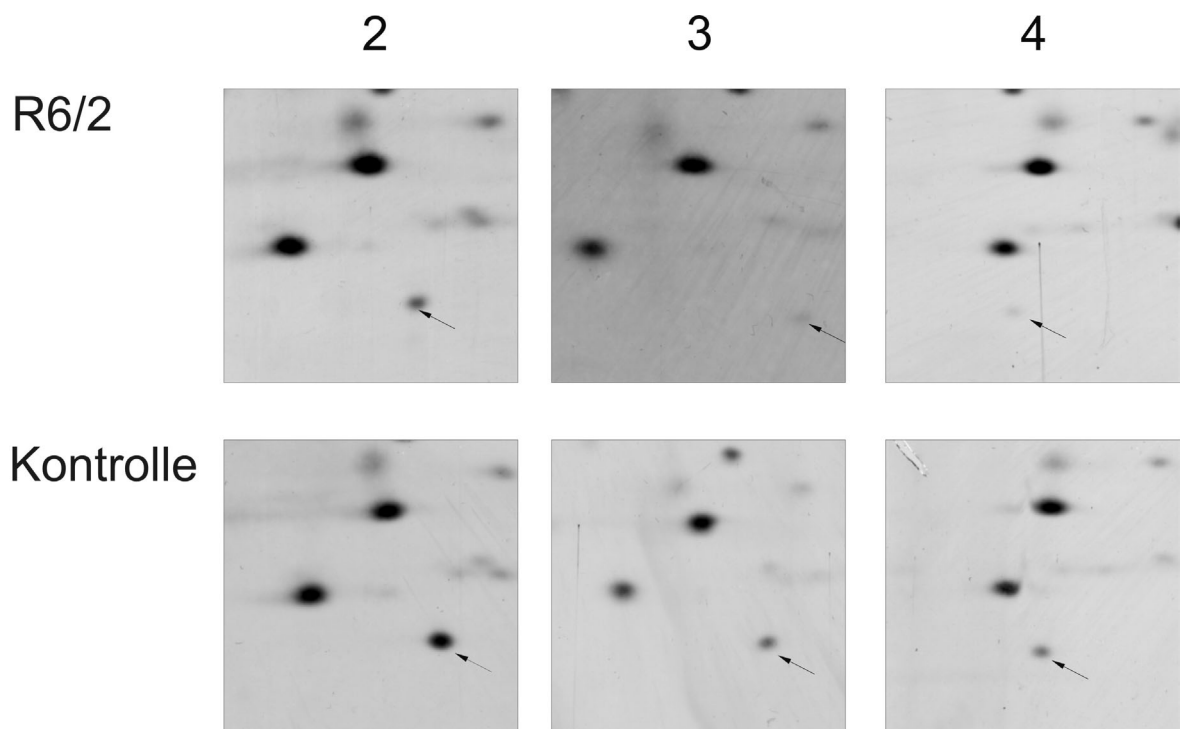


Abb. 9: ABC Expression in der Kernfraktion nahe dem Endstadium der Erkrankung.

Gelausschnitte von drei repräsentativen Probenpaaren (2, 3 und 4) zeigen eine verminderte Expression von ABC in der Kernfraktion von 12 Wochen alten R6/2 Mäusen.

5.1.2.1 Verminderung der Expression von AAT 1-5 mit dem Fortschreiten der Erkrankung

Im Frühstadium der Erkrankung im Alter von vier Wochen war bei R6/2 Mäusen AAT 1-5 heterogen exprimiert (Tab. 6). In einer R6/2 Maus war die AAT 1-5 Expression auf einem vergleichbaren Niveau wie bei zwölf Wochen alten Kontrollmäusen, wohingegen andere R6/2 Mäuse überhaupt keine nachweisbare Expression zeigten. Die Expression von AAT 1-5 bei vier Wochen alten Kontrollmäusen war jedoch genauso heterogen wie bei R6/2 Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass AAT 1-5 bei R6/2 Mäusen anfänglich auf einem Niveau sehr ähnlich dem der Kontrollmäuse exprimiert wurde. Nach dem Fortschreiten der Erkrankung konnte im Alter von acht Wochen AAT 1-5 im Gehirn bei fünf von acht R6/2 Mäusen nur noch in geringen Mengen gefunden werden, wohingegen Kontrollmäuse im Alter von acht Wochen ein hohes Expressionsniveau des Proteins zeigten (Abb. 10 und Tab. 6). Die Expressionsabnahme der drei Spots erfolgte gleichzeitig, was auf eine Beteiligung aller drei Varianten im gleichen oder einem eng verknüpften Prozess hindeutet. Nahe dem Endstadium der Erkrankung im Alter von zwölf Wochen ist, wie unter 5.1.1.1 bereits dargestellt, keine Expression von AAT 1-5 bei R6/2 Mäusen mehr

nachweisbar. Die Expression bei Kontrollmäusen in diesem Alter war hoch (Abb. 4, 10 und Tab. 6). Das Expressionsmuster des vierten Proteinspots korreliert während des Krankheitsverlaufs nicht vollständig mit dem Dreispotmuster an den untersuchten Zeitpunkten, der Trend stimmt jedoch überein.

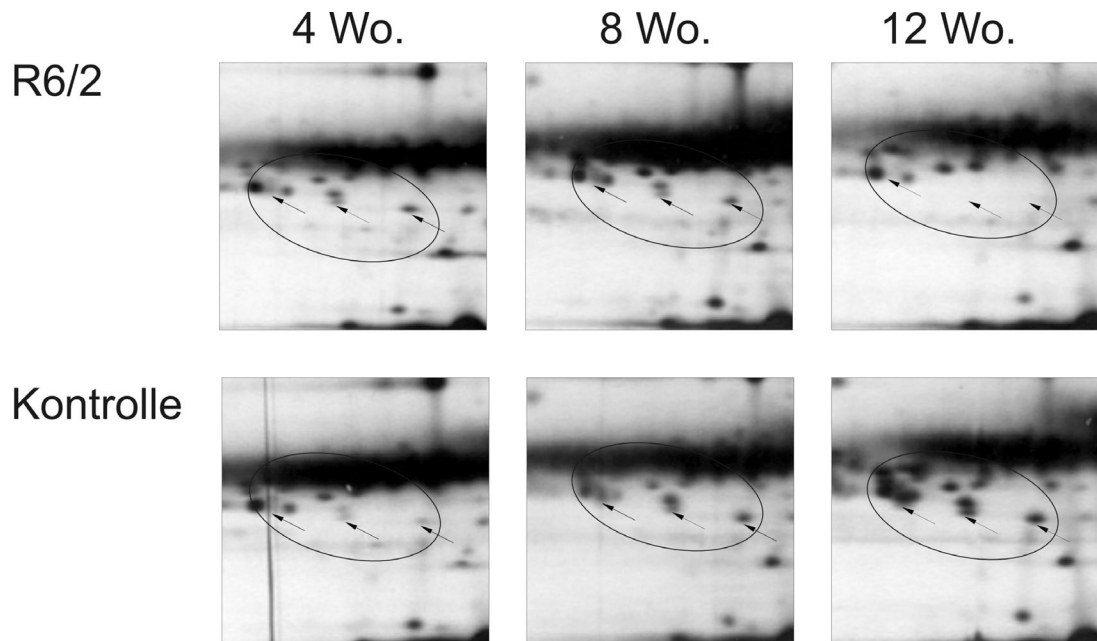


Abb. 10: AAT Expression im Verlauf der Erkrankung.

Gelausschnitte jeweils eines repräsentativen Probenpaares im Alter von 4, 8 und 12 Wochen von R6/2 und Kontrollmäusen werden gezeigt (Tab. 6). Eine Reduktion von AAT bei R6/2 Mäusen (Pfeile) erfolgt parallel zum Fortschreiten der Erkrankung.

5.1.2.2 Verminderung der Expression von ABC mit dem Fortschreiten der Erkrankung

Die Menge an exprimiertem ABC stieg bei Kontrollmäusen mit zunehmendem Alter stetig an. Die Zunahme war bei allen Mäusen gleich. Die Expression bei R6/2 Mäusen verblieb höchstens auf dem Level von vier Wochen (Abb. 11 und Tab. 6). Eine Heterogenität zwischen den Probenpaaren, wie bei AAT 1-5 (vier und acht Wochen), war nicht zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass das Protein im Verlauf der Erkrankung verbraucht oder/und in geringerem Maße produziert wurde.

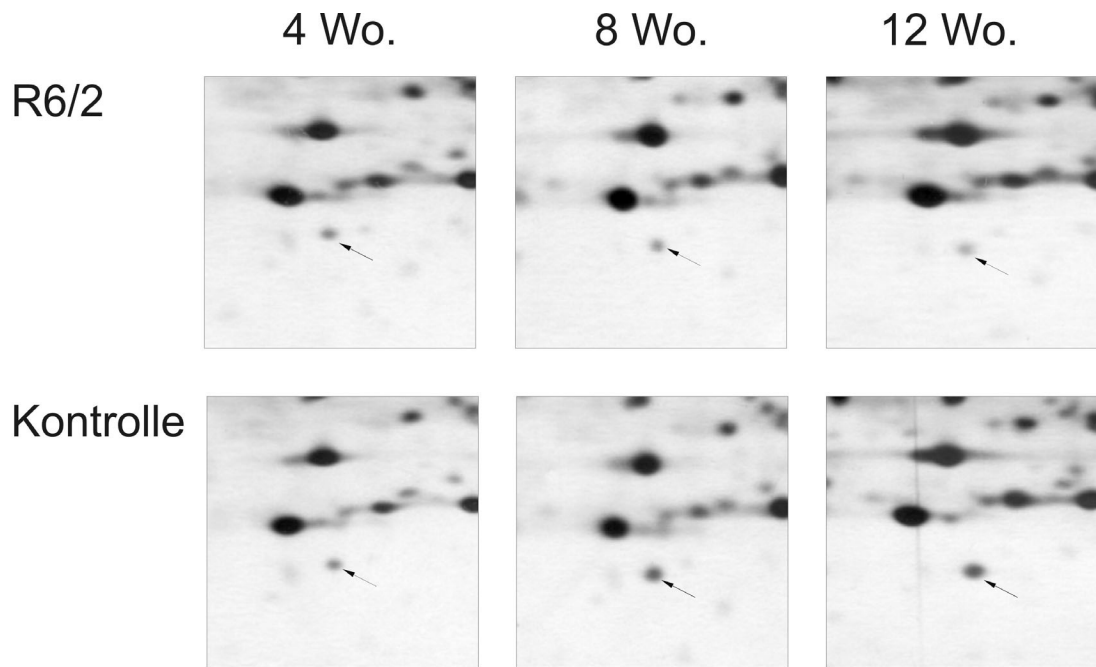


Abb. 11: ABC Expression im Verlauf der Erkrankung.

Gelausschnitte jeweils eines repräsentativen Probenpaares im Alter von 4, 8 und 12 Wochen von R6/2 und Kontrollmäusen werden gezeigt (Tab. 6). Die ABC Expression bei R6/2 Mäusen (Pfeile) nimmt während des Krankheitsverlaufs im Gegensatz zur Kontrolle nicht zu.

5.1.3 Untersuchung der Geschlechtsspezifität der Expression der differentiell exprimierten Proteine bei der Maus

In Vorversuchen mit C57Bl/6 Mäusen wurde nun die Geschlechtsspezifität der Expression von AAT 1-5 und ABC im Gesamtgehirn und einzelnen Gehirnregionen untersucht. An dieser Stelle ist es wichtig anzumerken, dass die 2D Gel Spotmuster von CBAxC57Bl/6 Mäusen (genetischer Hintergrund der transgenen R6/2 Mäuse und Kontrollmäuse) und C57Cl/6 Mäusen ziemlich gut miteinander übereinstimmen und die Positionen und Intensitäten der Spots (Kontrolltiere) der beiden Proteine von Interesse (AAT und ABC) in beiden Mäusestämmen identisch sind.

5.1.3.1 Geringere Expression von AAT 1-5 in weiblichen als in männlichen Mäusen

Die bisherigen Ergebnisse wurden ausschließlich unter Verwendung von männlichen Mäusen erzielt. Nun sollten auch Gehirne von weiblichen Mäusen untersucht werden. Auf der Ebene des Gesamtgehirns konnte keine AAT 1-5 Expression in weiblichen C57Bl/6 Mäusen nachgewiesen werden (Tab. 8A). Eine Untersuchung verschiedener Gehirnregionen, von drei weiblichen Mäusen ergab, dass AAT 1-5 in bestimmten

Regionen in mittlerer bis geringer Menge exprimiert wurde (Tab. 8B). Der Bereich mit der höchsten Expression war der *Nervus Trigeminus*, aber auch in anderen Regionen, wie der Hypophyse, dem Motorkortex, dem Hippocampus, den Bulbi Olfactorii und dem Cerebellum wurde das SERPIN nachgewiesen (Tab. 8B). Der nicht geglückte Nachweis von AAT 1-5 auf der Ebene des Gesamtorgans, könnte auf Verdünnung zurückzuführen sein. Große Gehirnregionen wie der Kortex, das Mittelhirn und das Cerebellum exprimierten AAT 1-5 auf sehr geringem oder nicht nachweisbarem Niveau (Tab. 8B). Der Beitrag dieser Gehirnregionen zum Extrakt könnte das in anderen Gehirnregionen vorhandene AAT 1-5 soweit verdünnt haben, dass die Nachweisgrenze der Silberfärbung (2 ng) im Gesamtgehirn unterschritten worden sein könnte.

5.1.3.2 Gleiches Expressionsniveau von ABC in weiblichen und männlichen Mäusen

ABC wurde im Gehirn von männlichen und weiblichen Tieren exprimiert (Tab. 8A). Das Expressionsniveau von ABC in verschiedenen Gehirnregionen bei weiblichen Mäusen entsprach der Expression im Gesamtgehirn beim Männchen mit Ausnahme des *Nervus Trigeminus* (sehr hoch) und der Hypophyse (gering) (Tab. 8B und Abb. 15).

5.1.4 Veränderte Proteinexpression im Endstadium der Erkrankung beim Menschen

Die drei Proteine (AAT, CTS und ABC), deren Expression sich zwischen dem R6/2 Mausmodell und der Kontrolle HD-spezifisch unterschied, wurden nun in drei menschlichen Gehirnregionen von HD postmortem Gewebe und Blutplasma untersucht (Tab. 7).

5.1.4.1 Veränderte Expression von AAT bei HD postmortem Gehirnen

Eine Gruppe bestehend aus 6 Spots wurde auf der Gelhälfte mit niedrigem pH-Wert (3,5 – 6) gefunden, während in Kontrollgelen im gleichen Bereich nur drei Spots zu sehen waren (Abb. 12). Dies deutet auf Spotduplizierung hin, welche durch eine Erhöhung des Molekulargewichts oder durch eine Veränderung der Proteinstruktur hervorgerufen worden sein könnte. Diese veränderte Expression wurde im Striatum und Parietallappen von einer weiblichen und einer männlichen Person, welche von HD betroffen waren, gefunden (Abb.

Tab. 7: Beschreibung der menschlichen HD und Kontrollgewebe und Blutplasma Proben

| Gehirnbezeichnung | Herkunft des Gewebes | Gehirn-region | Pathologie-grad ^[a] | Alter zum Entnahmepunkt [Jahre] | Geschlecht | Postmortemintervall [Stunden] |
|-------------------|----------------------|---------------|--------------------------------|---------------------------------|------------|-------------------------------|
| 56 ^[b] | LMU ^[c] | Str, Ptl; | 2-3 | 56 | w | 56 |
| 93 | LMU | Str; Ptl; | 2-3 | 61 | m | 9 |
| 99 | LMU | Str, Tha; | 0 | 55 | w | 14 |
| 104 | LMU | Str; Ptl; | 0 | 59 | m | ? |
| B3703 | HBTRC | AGC | 4 | 61 | w | 25 |
| B4226 | HBTRC | AGC | 4 | 62 | w | 28 |
| B4356 | HBTRC | AGC | 4 | 61 | w | 24 |
| B4381 | HBTRC | AGC | 4 | 55 | w | 23 |
| B3700 | HBTRC | AGC | 0 | 62 | w | 16 |
| B3813 | HBTRC | AGC | 0 | 58 | w | 20 |
| B3959 | HBTRC | AGC | 0 | 59 | w | 18 |
| B4625 | HBTRC | AGC | 0 | 53 | w | 24 |
| "F" | CCM | Blut (Plasma) | ? | | m | - |
| "M" | CCVK | Blut (Plasma) | 0 | | m | - |

^[a]Schweregrad der Erkrankung bestimmt nach den Kriterien von Vonsattel [54]; ^[b]Aus den Gehirnen 56 und 99 sowie 93 und 104 wurden Probenpaare gebildet; ^[c]Abkürzungen: LMU, Institut für Neuropathologie, „Ludwig Maximilian“ Universität München HBTRC, Harvard Brain Tissue Resource Center, McLean Hospital, Belmont, MA, USA; CCM, Klinik für Neurologie, Charite Campus Mitte, Berlin; CCVK, Institut für Humangenetik, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin; Str, Striatum; Ptl, Parietallappen; AGC, vorderer Gyrus Cinguli; w, weiblich; m, männlich.

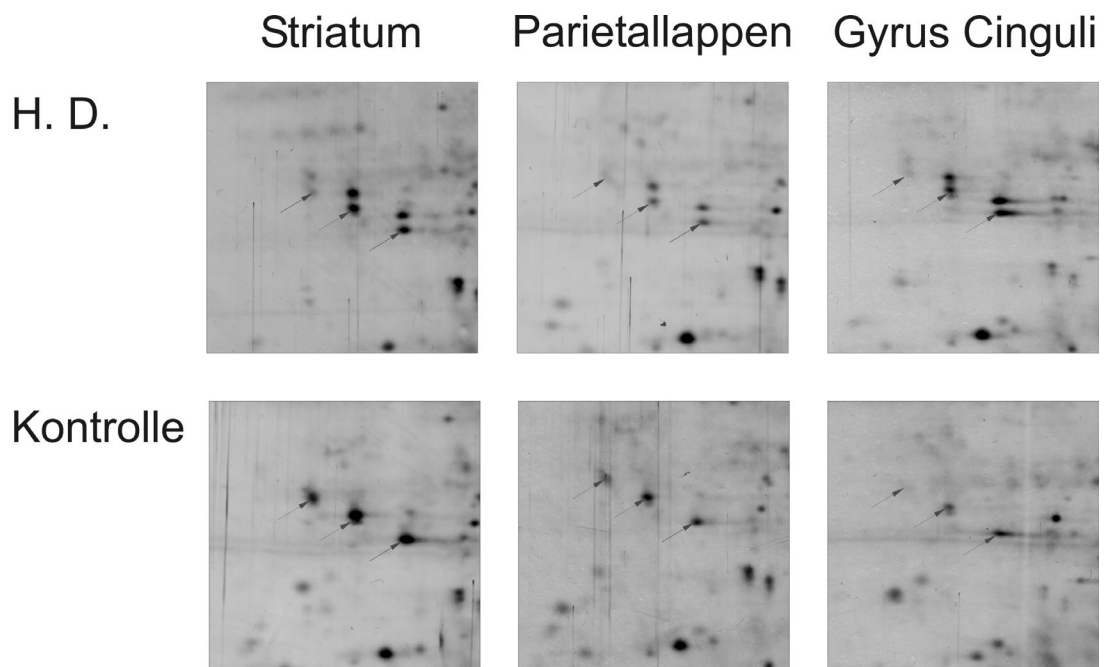


Abb. 12: Expression von AAT in drei Regionen von Postmortem-Gehirnen beim Menschen.

Die Abbildung zeigt Gelausschnitte von drei Gehirnregionen, Striatum, Parietallappen und Gyrus Cinguli von Postmortem-Gehirnen von Individuen im Endstadium der Erkrankung und im Alter von ungefähr 60 Jahren (genaues Alter siehe Tab. 7). Die Striatum und Parietallappenproben stammen von den Patienten 93 (HD) und 104 (Kontrolle), die AGC Probe stammt von den Patientinnen B3703 und B3700 (siehe Tab. 7). Pfeile zeigen ein Sechsspotmuster in HD und ein Dreispotmuster in Kontrollgehirnen.

12). Zwei von vier Proben vom vorderen Gyrus Cinguli von weiblichen HD Patienten

zeigten das gleiche Muster (Abb. 12 und Abb. 13). Die vier am stärksten gefärbten Spots wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie als das SERPIN AAT identifiziert (Datenbankeintrag: α 1-antitrypsin precursor; Swiss Prot. Nr.: P01009), das homologe Protein, welches auch im Mausmodell, unter anderem im Gehirn differentiell exprimiert wurde. Der pI der AAT-Spotgruppe lag bei 4,7 und das Molekulargewicht bei ungefähr 40 kDa. Die Spots unterschieden sich durch einen geringeren pI-Wert (0,6 pH-Einheiten) und einem niedrigeren Molekulargewicht (20 kDa) von denen die bei der Maus gefunden wurden. Diese Unterschiede deuten möglicherweise auf eine Prozessierung von AAT hin. Bei den vorderen Gyrus Cinguli Probenpaaren war die Spotduplizierung auch bei einem Kontrollgehirn zu sehen (Abb. 13). Dieses Gehirn war von einer frischen Blutung im zerebralen und subarachnoiden Raum und einer moderaten, akuten Enzephalopathie des hypoxisch-ischemischen Typs (Bericht der Neuropathologie bereitgestellt durch das „Harvard Brain Tissue Resource Center“) betroffen. Bei dieser Gehirnregion wurde ein Anstieg der Expression des „Glial Fibrillary Acidic Protein“ (GFAP) festgestellt, was auf Gliose in dieser Gehirnregion schließen lässt. In zwei der drei verbleibenden Kontrollgehirne des vorderen Gyrus Cinguli wurden keine Abnormitäten diagnostiziert. Das dritte Gehirn zeigte einen schwach differenzierten Tumor, welcher mit den Kriterien für ein metastasierendes Melanom übereinstimmt (B4625; Bericht der Neuropathologie bereitgestellt durch das „Harvard Brain Tissue Resource Center“). Dieses Kontrollgehirn zeigte jedoch keine Spotduplizierung und keine Erhöhung des Gliosemarkers GFAP (Abb. 13). Vorläufige Untersuchungen bei einer Blutplasmaprobe von einem HD Patienten („F“) zeigten eine leichte Erhöhung der AAT Konzentration (Abb. 14) im Blut. Es konnte jedoch kein Doppelspotmuster von AAT, wie bei den drei untersuchten menschlichen Gehirnregionen, Striatum, Parietallappen und Gyrus Cinguli, (Abb. 14 vs. Abb. 12 und 13), gefunden werden.

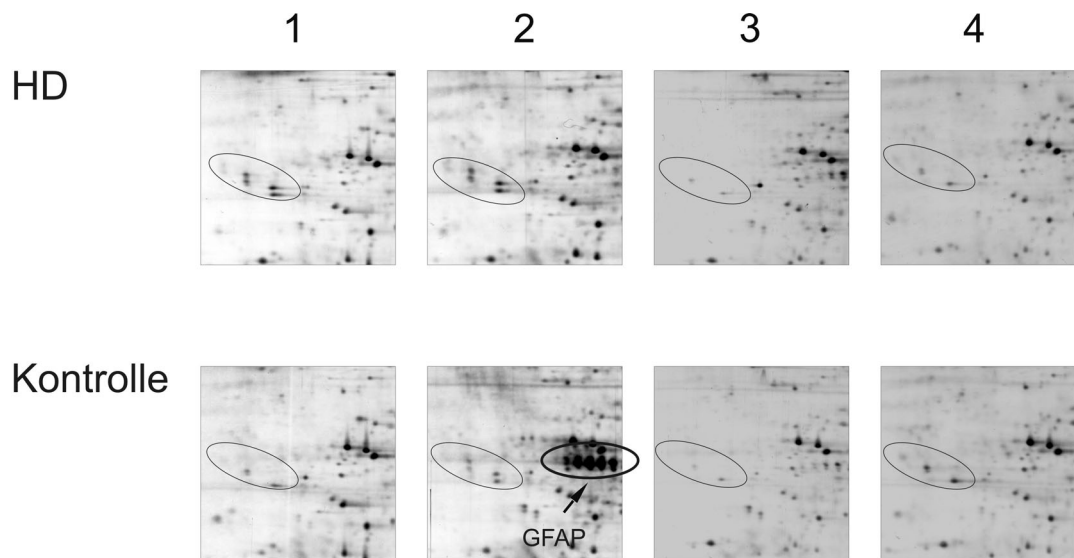
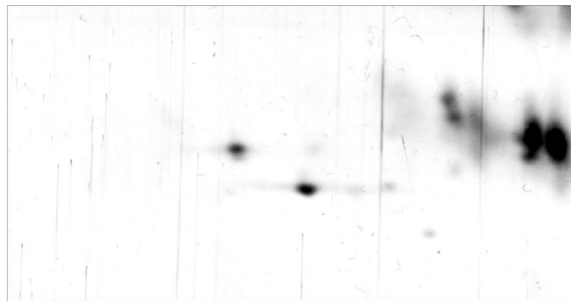


Abb. 13: Expression von AAT im vorderen Gyrus Cinguli bei Postmortem-Gehirnen.

Die Probenpaare (HD/Kontrolle) 1 (B3703 und B3700), 2 (B4226 und B3813), 3 (B4356 und B3959) und 4 (B4381 und B4625) zeigen die Expressionen von AAT bei vier verschiedenen, weiblichen HD Patienten im vorderen Gyrus Cinguli und den entsprechenden dem Alter und Geschlecht angepassten Kontrollen. Das AAT Spotmuster ist mit einer Ellipse umrandet. Das Sechsspotmuster tritt nur bei zwei von vier Probenpaaren von HD (1 und 2) auf. Das Doppelspotmuster bei der Kontrolle im Probenpaar zwei geht mit erhöhter Expression von GFAP, einem Marker für Gliose, einher.

HD



Kontrolle

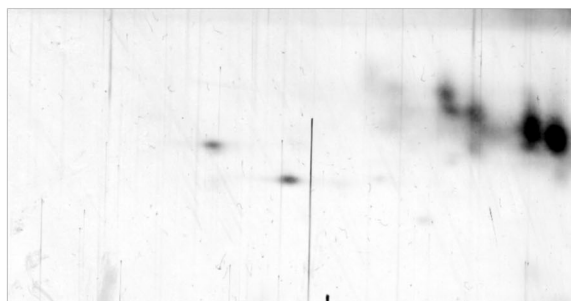


Abb. 14: Expression von AAT im Blut (Plasma) von einem HD Patienten während der Erkrankung

Die Gelausschnitte zeigen die Expression von AAT im Blut (Plasma) des HD Patienten "F" und in einer Kontrollperson „M“. Eine Erhöhung der AAT Expression ist beim HD Patienten zu erkennen.

5.1.4.2 Expression von ABC ist im menschlichen Gehirn nicht nachweisbar

Die Isoform des Proteins ABC, welche sich bei der Maus im Verlauf der Erkrankung änderte, konnte in den untersuchten, menschlichen Gehirnregionen nicht gefunden werden (Resultate werden nicht gezeigt). Dies ist wahrscheinlich auf eine zu geringe Expression der bei der Maus gefundenen Isoform von ABC im menschlichen Gehirn zurückzuführen, da der Spot im menschlichen Herzen bereits gefunden wurde [102]. Der pI und das Molekulargewicht von ABC sind bei Mensch und Maus nahezu identisch [102].

5.2 Expression von krankheitsrelevanten Proteinen in verschiedenen Geweben

In R6/2 Mäusen wurden Proteinaggregate, die N-terminale Fragmente des HD-verursachenden Proteins Htt enthalten, in Form von nukleären Einschlüssen in verschiedenen Geweben außerhalb des zentralen Nervensystems gefunden [63]. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich die Expression der im Gehirn gefundenen Proteine (AAT, CTS und ABC) auch in anderen Organen krankheitsspezifisch ändert. Mit der Untersuchung des Gehirns wurde ein Organ ausgewählt, welches hauptsächlich aus dem Ektoderm, einem der drei embryonalen Keimblätter, gebildet wird. Bei der Auswahl der weiteren, untersuchten Organe wurde nun je ein Vertreter des Mesoderms (Herz) und des Endoderms (Leber) ausgewählt. Da R6/2 Mäuse reproduktive Schwierigkeiten aufweisen [41] und die Testes von fünf in der Literatur bereits untersuchten Geweben (Muskel, Testes, Leber, Niere und Milz) den höchsten Atrophiegrad aufwiesen [63], wurden diese, als weiterer Vertreter des Mesoderms, untersucht.

5.2.1 Voruntersuchung zur Expression von AAT 1-5 und ABC in verschiedenen Geweben und Gehirnregionen

5.2.1.1 Expression von AAT 1-5 in unterschiedlichen Geweben

AAT 1-5 konnte im Herzen, in der Leber und den Testes von C57Bl/6 Mäusen nachgewiesen werden (Tab. 8A).

Tab. 8: Verteilung von AAT 1-5 und ABC im Gewebe und in Gehirnregionen. Verteilung im Gewebe (Oben). : Verteilung in den Gehirnregionen von weiblichen Mäusen (Unten)

| Gewebe | AAT 1-5 | | ABC | |
|--------|----------|----------------------|----------|----------|
| | weiblich | männlich | weiblich | männlich |
| Gehirn | - | +++ | +++ | +++ |
| Herz | + | +++ | +++ | +++ |
| Leber | - | +++ | - | - |
| Milz | - | n. d. ^[a] | - | - |
| Testes | n. v. | +++ | n. v. | - |

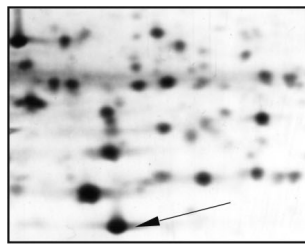
| Gehirnregion ^[b] | AAT 1-5 | ABC |
|-----------------------------|---------|---------------------|
| Nervus Trigemini | ++ | ++++ ^[c] |
| Hypophyse | ++ | + |
| Motorikortex | + | +++ |
| Hippocampus | + | +++ |
| Bulbi Olfaktorii | + | ++ |
| Cerebellum | - | +++ |
| Striatum | - | +++ |
| Frontaler Kortex | - | +++ |
| Mittelhirn | - | +++ |
| Rhombenzephalon | - | +++ |
| Thalamus | - | +++ |
| Septum | - | +++ |

^[a]Erklärung der Symbole siehe Tab. 6; n. d. = nicht durchgeführt; n. v. = bei weiblichen Mäusen nicht vorhanden;

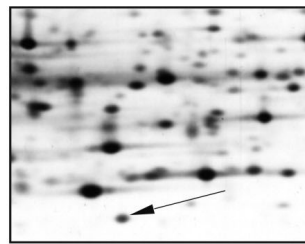
^[b]Der Motorikortex enthält die Amygdala und die Area Entorhinalis. Die Region, welche als Thalamus bezeichnet worden ist, enthält auch den Hypothalamus; ^[c]++++ weist auf eine Expression von ABC in dieser Gehirnregion hin, als die höher ist als auf der Ebene des Gewebes im Gehirn und Herzen.

5.2.1.2 ABC Expression in unterschiedlichen Geweben

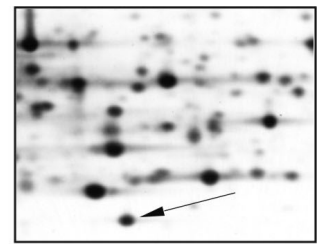
ABC wurde nur im Gehirn und Herzen von C57Bl/6 Mäusen detektiert (Tab. 8A; siehe auch Abb. 7, 8, 9, 11 und 15 (Gehirn); Abb. 18 (Herz)). Die Expression in den verschiedenen Gehirnregionen war gleichmäßig hoch mit Ausnahme des Nervus Trigemini (sehr hoch) und der Hypophyse (niedrig) (Tab. 8B). Abb. 15 zeigt exemplarisch am Beispiel der Expression von ABC in verschiedenen Gehirnregionen, wie die Intensitätsunterschiede der ABC Spots verschiedenen Symbolen (+ - +++) zugeordnet wurden. Die mit den Organen von gesunden Mäusen gewonnenen Daten für die Expression von AAT und ABC in verschiedenen Geweben bildeten nun die Grundlage für die Untersuchung der Expression von AAT 1-5 und ABC in Herz, Testes und Leber von R6/2 Mäusen.



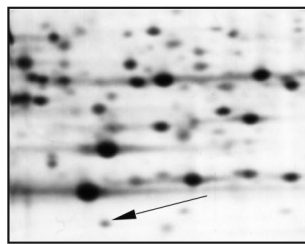
Nervus Trigeminus



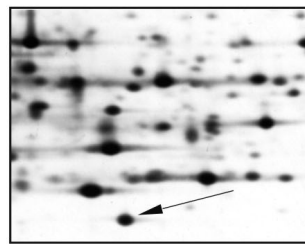
Bulbi Olfactorii



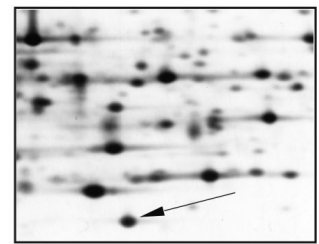
Mittelhirn



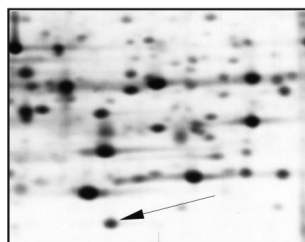
Hypophyse



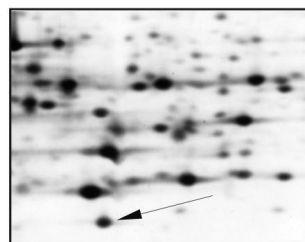
Cerebellum



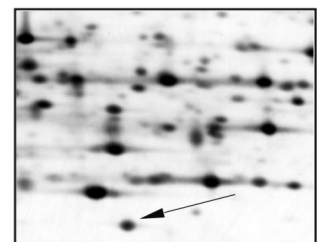
Rhombencephalon



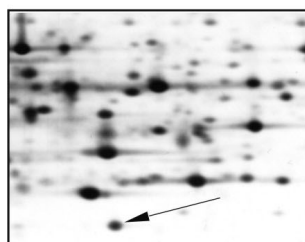
Motorkortex



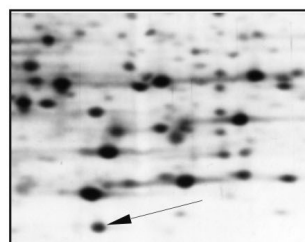
Striatum



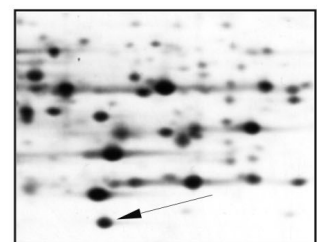
Thalamus



Hippocampus



Frontaler Kortex



Septum

Abb. 15: Verteilung der ABC Expression in verschiedenen Gehirnregionen

Expression des Chaperons ABC in verschiedenen Gehirnregionen. Es wird eine Korrelation der Spotintensitäten zu den Intensitätssymbolen (+ bis +++) in Tab. 8B gezeigt. Der Pfeil zeigt den ABC Spot in den verschiedenen Gelausschnitten aus der zytoplasmatischen Fraktion der verschiedenen Gehirnregionen.

5.2.2 Untersuchung der differentiellen Proteinexpression im Herzen

Es wurde nun die zytoplasmatische/nukleoplasmatische Fraktion des Proteinextrakts aus dem Herzen von R6/2 Mäusen auf differentielle Proteinexpression der beiden im Gehirn gefundenen Proteine, AAT 1-5 und ABC, untersucht. Außerdem sollte geklärt werden, ob weitere Proteine in diesem Organ zwischen R6/2 und Kontrollmäusen krankheitsspezifisch differentiell exprimiert wurden.

5.2.2.1 Verringerte Expression von AAT im Herzen von R6/2 Mäusen

AAT 1-5 wurde auch im Herzen bei R6/2 Mäusen nahe dem Endstadium der Erkrankung stark vermindert exprimiert (Abb. 16 A). Die Anzahl der unterschiedlichen AAT 1-5 zugeordneten Spots erweiterte sich von drei im Gehirn auf mindestens fünf im Herzen (Abb. 16 A). Die im Herzen gefundene Dreispotgruppe (Abb. 16 A, rechte Seite) war wie auch schon im Gehirn nur in Kontrollgehirnen vorhanden. Neben der bereits identifizierten

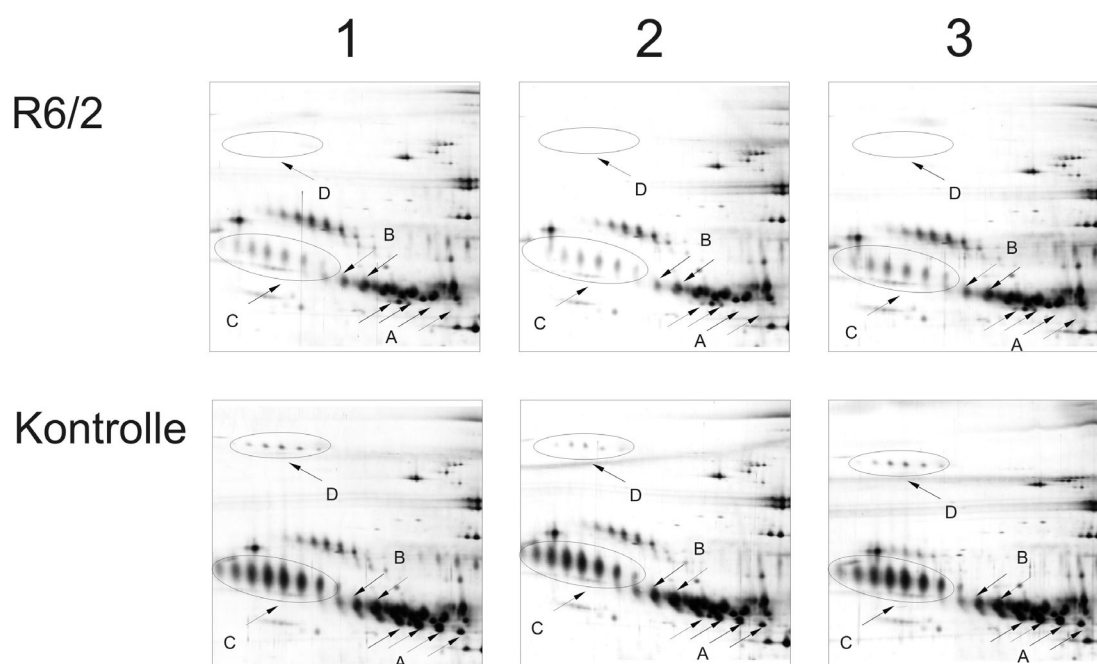


Abb. 16: AAT und CTS Expression im Herzen nahe dem Endstadium der Erkrankung.

Gelausschnitte aus dem niedrigen pH-Bereich von drei repräsentativen Probenpaaren (1, 2 und 3) aus zytoplasmatischen Extrakten des Herzens von 12 Wochen alten Mäusen zeigen Unterschiede in der Expression von AAT (AAT 1-5; A und AAT 1-4; B; alle 7 Spots verändert) und CTS (C und D). Das SERPIN CTS tritt in diesem Gewebe als 70 kDa, „C“ und 170 kDa „D“ Isoform auf.

AAT-Isoform AAT 1-5 (Abb. 16 A) wurde die Isoform AAT 1-4 (Abb. 16 B;

Datenbankeintragung: alpha1-antitrypsin 1-4 precursor, Swiss-Prot # Q00897) mit zwei Spots eindeutig identifiziert. Die Expression von AAT 1-4 war im Herzen bei R6/2 Mäusen geringfügig erniedrigt (Abb. 16 B). Wie bei AAT 1-5 wich das elektrophoretisch bestimmte Molekulargewicht von AAT 1-4 von ca. 60 kDa vom berechneten (46.0 kDa) deutlich (14 kDa) ab.

5.2.2.2 *Verminderte Expression von Contraspin im Herzen von R6/2 Mäusen*

Ein weiteres, bei HD in der Maus differentiell exprimiertes SERPIN, Contraspin (CTS) (Datenbankeintrag: contraspin; Swiss-Prot # Q62257), konnte neben dem Gehirn, auch im Herzen identifiziert werden (Abb. 16 (C und D) und 17). Spotgruppen von CTS wurden an zwei verschiedenen Orten im Gel gefunden. Die Gruppen besaßen einen gemeinsamen, beobachteten pI von ungefähr 5 und zwei unterschiedliche Molekulargewichte von 70 kDa (Gruppe mit 7 Spots; Abb. 16 C) und 170 kDa (Gruppe mit 6 Spots; Abb. 16 D und 17). Wie bereits bei AAT 1-4 und AAT 1-5 festgestellt, wich auch das Molekulargewicht der 70 kDa Isoform, welches mit Hilfe der Mobilität in der Großgel 2D-Elektrophorese bestimmt worden war, beträchtlich (23 kDa höher) von dem berechneten Wert (46,6 kDa) [103] ab.

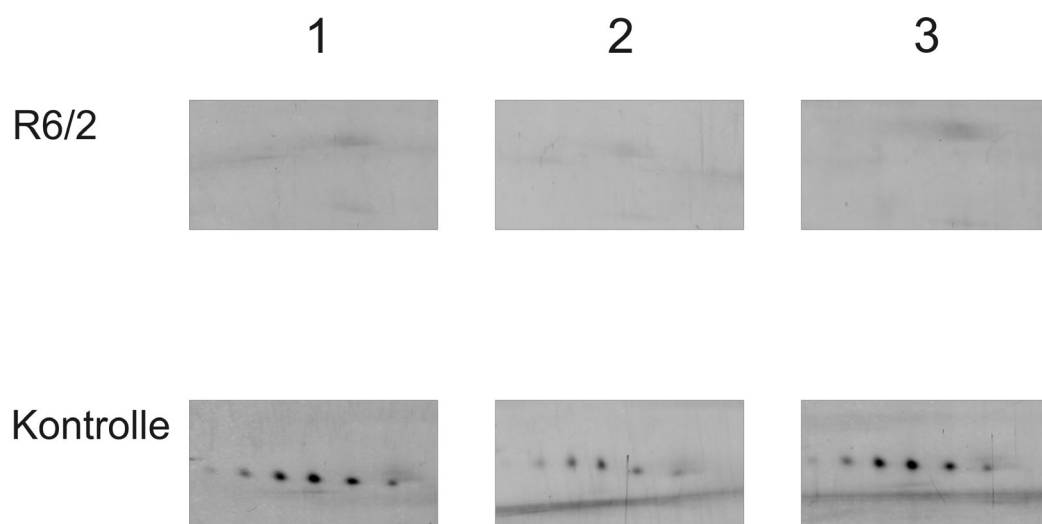


Abb. 17: Expression der 170 kDa Isoform von CTS.

Die Vergrößerung der Gelausschnitte der drei Probenpaare aus Abb. 12 (D) zeigt ein Muster aus mindestens 6 Spots, welche bei 12 Wochen alten R6/2 Mäusen nicht mehr detektierbar sind.

5.2.2.3 *Gleiche Expression von ABC in R6/2 – und Kontrollmäusen*

ABC wird im Herzen bei R6/2 und Kontrollen auf hohem Niveau exprimiert. Die Lokalisation des einzelnen Spots im Gel war im Gehirn und Herzen identisch. Die Spotintensitäten sind auch im Alter von zwölf Wochen bei sehr weit fortgeschrittener Erkrankung nahezu identisch, d. h. es gibt keine differentielle ABC Expression im Herzen (Abb. 18).

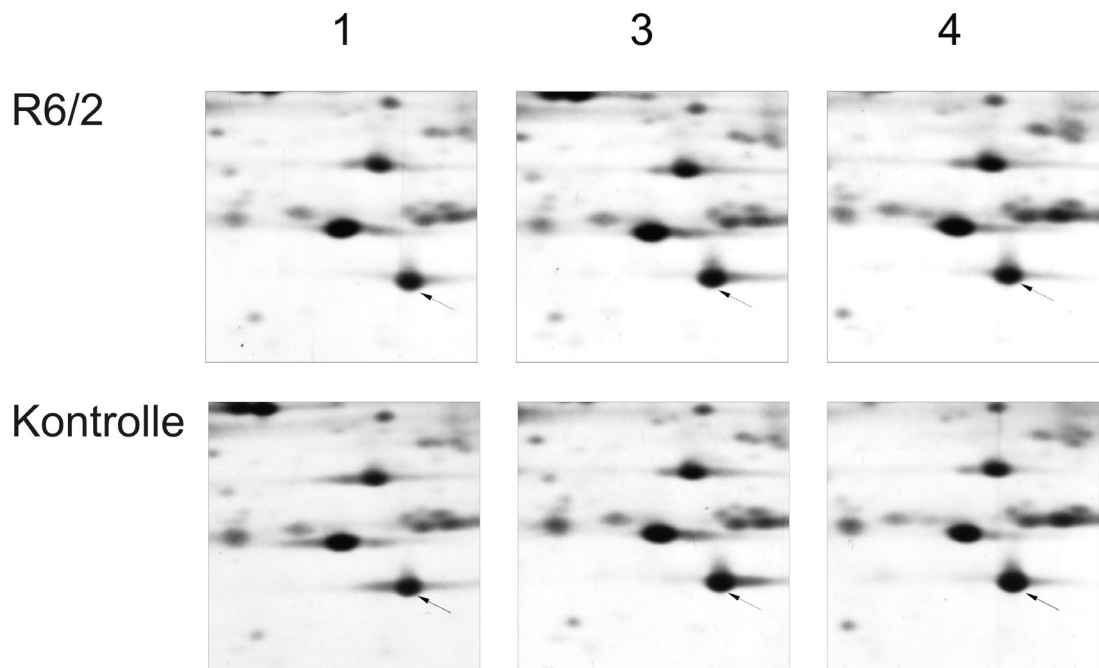


Abb. 18: Unveränderte Expression von ABC im Herzen nahe dem Endstadium der Erkrankung.

Gelausschnitte der drei dargestellten, repräsentativen Probenpaare (1, 3 und 4) von 12 Wochen alten Mäusen zeigen in der zytoplasmatischen Fraktion eine unveränderte Spotintensität (Pfeil) von ABC.

5.2.2.4 *Expression von AAT und CTS im Verlauf der Erkrankung*

Im Herzen beginnt während der Erkrankung die Expression der SERPINE AAT und CTS (beide Isoformen) im Alter von acht Wochen abzunehmen, wobei eine ausgeprägte Expressionsverringerung erst im Alter von zwölf Wochen, nahe dem Endstadium der Erkrankung, zu sehen ist (Tab. 9 und 10).

Tab. 9: : Differentielle Proteinexpression in verschiedenen Geweben. Expression von AAT 1-5 in verschiedenen Geweben^[a] (Oben). Expression von MUPs im Krankheitsverlauf (Unten).

| Tiere | R6/2 | | | | Kontrolle | | | |
|---------------|--------|----------------------|-------|--------|-----------|-------|-------|--------|
| | Gehirn | Herz | Leber | Testes | Gehirn | Herz | Leber | Testes |
| 8 Wo. | | | | | | | | |
| 1 | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 2 | + | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| 3 | + | n. d. ^[b] | ++ | ++ | +++ | n. d. | +++ | +++ |
| 4 | - | n. d. | ++ | +++ | ++ | n. d. | +++ | +++ |
| 12 Wo. | | | | | | | | |
| 1 | - | - | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 2 | - | - | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 3 | - | - | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 4 | - | - | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ |

| Tiere | R6/2 | Kontrolle |
|---------------|------|-----------|
| 8 Wo. | | |
| 1 | +++ | +++ |
| 2 | +++ | +++ |
| 3 | +++ | +++ |
| 4 | +++ | +++ |
| 12 Wo. | | |
| 1 | + | +++ |
| 2 | + | +++ |
| 3 | + | +++ |
| 4 | + | +++ |

^[a]im Gehirn identifiziertes Drei-Spot-Muster von AAT 1-5 (Fig. 4 und 10, Pfeile); für die Erklärung der Symbole siehe Tab. 6; +++ ist das Expressionsniveau in dem jeweiligen Gewebe bei 12 Wochen alten Kontrollmäusen.

5.2.3 Untersuchung der differentiellen Expression von AAT, CTS und ABC in den Testes

Nachdem im Gehirn und im Herzen die beiden SERPINE, AAT und CTS, im Krankheitsverlauf vermindert exprimiert worden waren, wurde nun deren Expression und die von ABC bei stark atrophischen Testes von R6/2 Mäusen nahe dem Endstadium der Erkrankung auf eine krankheitsspezifische Veränderung untersucht. Der starke Gewichtsverlust der Testes parallel zum Fortschreiten der Erkrankung ließ auf die Identifizierung weiterer Proteine hoffen.

Tab. 10: Expression der beiden CTS Isoformen. 70 kDa Isoform in verschiedenen Geweben (Oben). 170 kDa Isoform im Herzen (Unten).

| Tiere | R6/2 | | | | Kontrolle | | | |
|------------------|------------------|----------------------|-------|--------|-----------|-------|-------|--------|
| | Gehirn | Herz | Leber | Testes | Gehirn | Herz | Leber | Testes |
| 8 Wo. | | | | | | | | |
| 1 ^[a] | ^[b] - | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ |
| 2 | - | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | + |
| 3 | + | n. d. ^[c] | + | + | ++ | n. d. | ++ | ++ |
| 4 | ++ | n. d. | ++ | ++ | ++ | n. d. | ++ | ++ |
| 12 Wo. | | | | | | | | |
| 1 | - | + | - | - | ++ | +++ | ++ | ++ |
| 2 | ++ | + | - | + | +++ | +++ | ++ | ++ |
| 3 | - | + | - | + | ++ | +++ | ++ | ++ |
| 4 | - | + | - | + | ++ | +++ | ++ | ++ |

| Tiere | R6/2 | Kontrolle |
|---------------|-------|-----------|
| 8 Wo. | | |
| 1 | +++ | +++ |
| 2 | ++ | +++ |
| 3 | n. d. | n. d. |
| 4 | n. d. | n. d. |
| 12 Wo. | | |
| 1 | - | +++ |
| 2 | - | ++ |
| 3 | - | +++ |
| 4 | - | +++ |

^[a]Die Probenpaare (R6/2 and Kontrolltiere) sind so angeordnet, dass mit dem höchsten AAT Expressionslevel bei R6/2 Mäusen in der Tabelle begonnen wird; ^[b] Erklärung der Symbole: +++ = Spot ist vorhanden (Spotintensität von Kontrollmäusen im Alter von 12 Wochen); ++ = Spot ist vorhanden, aber die Intensität ist vermindert; + = Spot ist vorhanden, aber die Intensität ist stark vermindert; - = Spot ist nicht nachweisbar; ^[c] n. d., nicht durchgeführt. Die Intensität der Kontrollspots war im Gehirn bei Contraspin sehr niedrig.

5.2.3.1 Verminderte Expression von AAT in den Testes von R6/2 Mäusen

AAT war in den Testes, wie im Herzen bereits gezeigt, in mindestens sieben Spots differentiell exprimiert (Abb. 19). Auch hier wurden sowohl die Isoform AAT 1-4 (2 Spots, Abb. 19 B) als auch AAT 1-5 (5 Spots, Abb. 19A) gefunden. Bei allen Probenpaaren konnte eine differentielle Expression von AAT 1-5 nachgewiesen werden (Abb. 19). Eine differentielle Expression von AAT 1-4 war nur in drei von vier Probenpaaren zu beobachten (Abb. 19, Probenpaar 4 (B), kein Unterschied). Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass die R6/2 Testes bei Probenpaar 4 im Gegensatz zu den

anderen Probenpaaren einen noch höheren Atrophiegrad aufwiesen. Diese wogen noch 20 mg, viel weniger als die Kontrolltestes mit 262 mg. Dies bedeutet, dass die R6/2 Testes nur noch 7,6 % (w/w) des Kontrollgewichtes besaßen, sodass also über 92 % (w/w) des Gewebes durch Atrophie verloren gegangen sind. Die Proteinzusammensetzung des Restgewebes bei R6/2 (Probenpaar 4) könnte durch diese starke Atrophie stark verändert worden sein. Möglicherweise besteht es nur noch aus Zellen mit höherem AAT Gehalt, welche als einzige überlebt haben könnten. Die Testes der R6/2 Maus des Probenpaares 3, bei dem der AAT 1-4 Expressionsunterschied noch detektierbar war, wog 34 mg, was ein 1,7-fach höheres Gewicht im Vergleich zu Probenpaar 4 (Abb. 19) bedeutet.

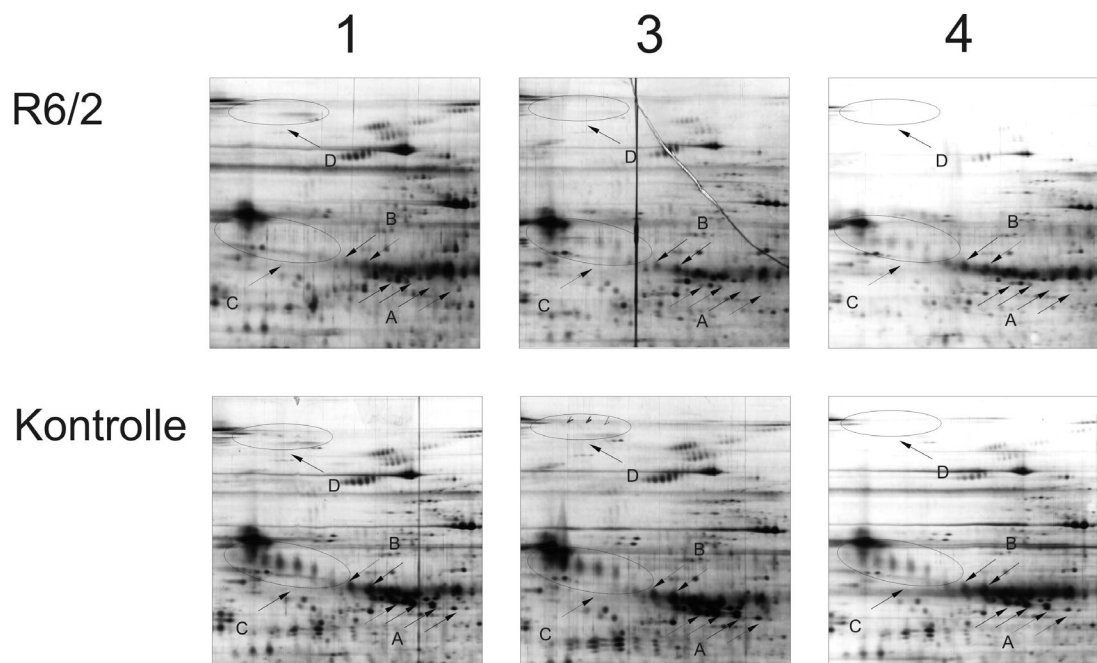


Abb. 19: Expression von AAT in Testes nahe dem Endstadium der Erkrankung

Gelausschnitte von drei repräsentativen Probenpaaren (1, 3 und 4) zeigen eine unterschiedliche Expression von AAT (A und B, alle 7 AAT Spots verändert) und CTS (C und D). Die Expression der schon im Herzen gefundenen 170 kDa Isoform von CTS (D) ist nur bei zwei der drei Probenpaare in der Kontrolle nachweisbar.

5.2.3.2 Verminderte CTS Expression in den Testes von R6/2 Mäusen

CTS unterschied sich bei zwölf Wochen alten Mäusen auch in den Testes in der Expression bei der 70 kDa Isoform, wobei die quantitativen Unterschiede etwas geringer als im Herzen waren. (Abb. 19 vs. Abb. 16). Die 170 kDa Isoform konnte in drei von vier Probenpaaren bei der Kontrolle jedoch nicht bei R6/2 nachgewiesen werden, wobei die

Intensität der Spots außer bei Probenpaar 1 nahe an der Nachweisgrenze lag (Abb. 19). Bei den untersuchten R6/2-Kontroll-Probenpaaren war auch die Expression von der 70 kDa CTS Spotgruppe bei zwölf Wochen alten Kontrollmäusen in den Testes geringer als im Herzen (Abb. 19 vs. 16). Es konnten keine weiteren, differentiell exprimierten, Spots gefunden werden.

5.2.3.3 Verminderte Expression von AAT und CTS im Verlauf der Erkrankung

Während des Fortschreitens der Erkrankung begann die Expression von AAT und CTS im Alter von acht Wochen geringfügig abzunehmen. Eine ausgeprägte Expressionsverringerung war erst im Alter von zwölf Wochen zu sehen ist (Tab. 9 und 10). Die Expression der 170 kDa-Isoform von CTS war im Alter von acht Wochen in den Testes kaum nachweisbar, sodass keine verlässlichen Angaben über den zeitlichen Verlauf des Expressionsniveaus bei dieser Spotgruppe gemacht werden können (Daten werden nicht gezeigt).

5.2.4 Untersuchung der differentiellen Expression von AAT, CTS und ABC in der Leber

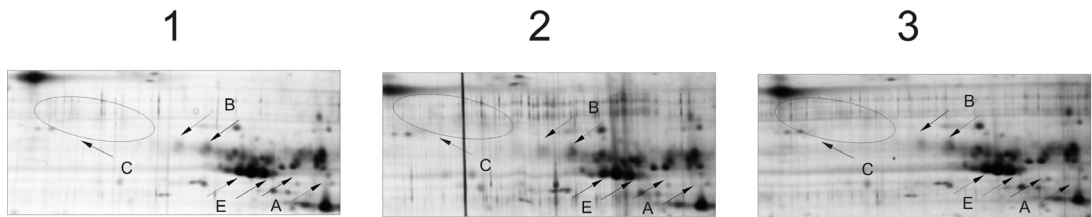
Durch die Untersuchung des Proteoms des Gehirns (Endoderm) und der aus dem Mesoderm stammenden Organe, Herz und Testes, wurden drei, im Krankheitsverlauf differentiell exprimierte Proteine, AAT, CTS und ABC identifiziert. Obwohl von einem hohen Gewichtsverlusts im Laufe der Erkrankung betroffen, fand sich in den Testes kein weiteres, krankheitsspezifisch verändert exprimiertes Protein. Dies lässt darauf schließen, dass die unterschiedliche Expression der gefundenen Proteine primär krankheitsspezifisch war, und nicht auf Sekundärprozesse wie z. B. Atrophie, zurückzuführen war. Die Untersuchung der Leber aus dem Endoderm rundet die Untersuchung der drei Keimblätter ab.

5.2.4.1 Verminderte Expression von AAT in der Leber von R6/2 Mäusen

AAT zeigte bei zwölf Wochen alten Mäusen in der Leber ein Expressionsniveau, welches geringer als im Herzen und ungefähr vergleichbar mit den Testes war (Abb. 20 vs. Abb. 16 und 19). AAT 1-5 war, wie in Herz und Testes, mit fünf Spots exprimiert. Zwei Spots mit differentieller Expression in Testes und Herz waren in der Leber nicht verändert (Abb. 19

A und 16 A (Pfeile links) vs. Abb. 20 E). Die drei Spots von AAT 1-5 in „A“, die zuerst im Gehirn identifiziert wurden, waren bei R6/2 Mäusen im Alter von zwölf Wochen nicht exprimiert. Die Variante AAT 1-4 in „B“ zeigte Unterschiede in der Expression zwischen R6/2 und Kontrolle.

R6/2



Kontrolle

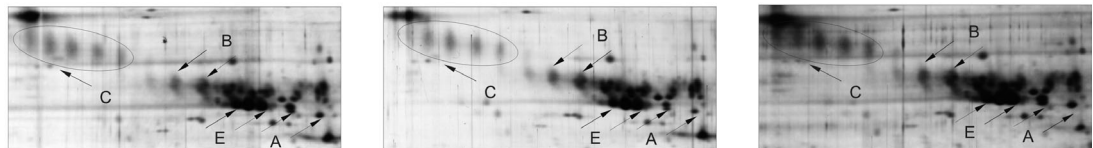


Abb. 20: Expression von AAT und CTS in der Leber während des Endstadiums der Erkrankung.

Bei den Gelausschnitten der dargestellten drei repräsentativen Probenpaare (1, 2 und 3) von 12 Wochen alten Mäusen ist die Expression von AAT 1-5 A und CTS (C) in R6/2 nicht mehr nachweisbar. Die AAT Variante in AAT 1-4 (B) zeigte eine mäßige Reduktion der Expression und Variante AAT 1-5 E war unverändert (5 Spots verändert; 7 Spots gesamt). Die 170 kDa Isoform von CTS war in der Leber nicht nachweisbar.

5.2.4.2 Verminderte CTS Expression in der Leber von R6/2 Mäusen

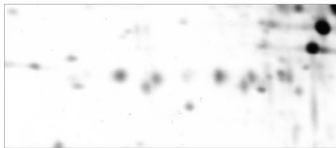
Eine Expression der 70 kDa Isoform von CTS (Abb. 20 C) war in R6/2 Mäusen im Alter von zwölf Wochen im Gegensatz zur Kontrolle nicht nachweisbar. Die 170 kDa Isoform von CTS war in der Leber im Gegensatz zu Herz und Testes auch in der Kontrolle nicht nachweisbar (Daten für Leber werden nicht gezeigt). Das allgemeine Expressionsniveau der 70 kDa Isoform von CTS war in der Leber von Kontrolltieren war geringer als im Herzen, aber vergleichbar mit den Testes und höher als im Gehirn.

5.2.4.3 *Stark verminderte Expression von Major Urinary Proteins in der Leber von R6/2 Mäusen*

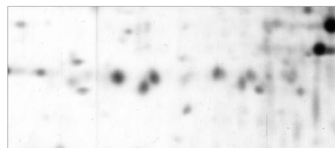
Ein außergewöhnlicher, aber leberspezifischer Unterschied in der Proteinexpression, bestand aus einem Muster von mindestens neun Spots, welche als zu den Major Urinary Proteins (MUPs) zugehörig identifiziert wurden (Datenbankeintrag: MUP1_mouse, Swiss-Prot # P11588). Die exakte MUP-Isoform für jeden Spot konnte mit Hilfe der Massenspektrometrie nicht zugeordnet werden. Ein pI Wert im Bereich von 4,9 bis 5,3 und ein Molekulargewicht von 22 kDa wurde für die Proteine mit Hilfe der Gelmobilität bestimmt. Diese Werte korrelieren gut mit Literaturdaten für den pI von 4,6 bis 5,3 [104] und einem berechneten Molekulargewicht von ungefähr 21 kDa (Datenblätter zu den Swiss-Prot. Einträgen für murines MUPs). Die Expression dieser Proteine war in zwölf Wochen alten R6/2 Mäusen stark reduziert (Abb. 21).

R6/2

1



2



3



Kontrolle

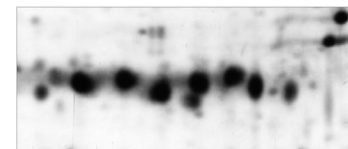
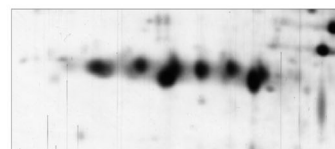
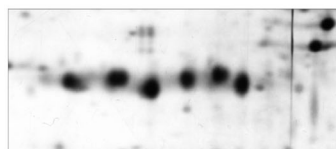


Abb. 21: MUPs Expression in der Leber nahe dem Endstadium der Erkrankung

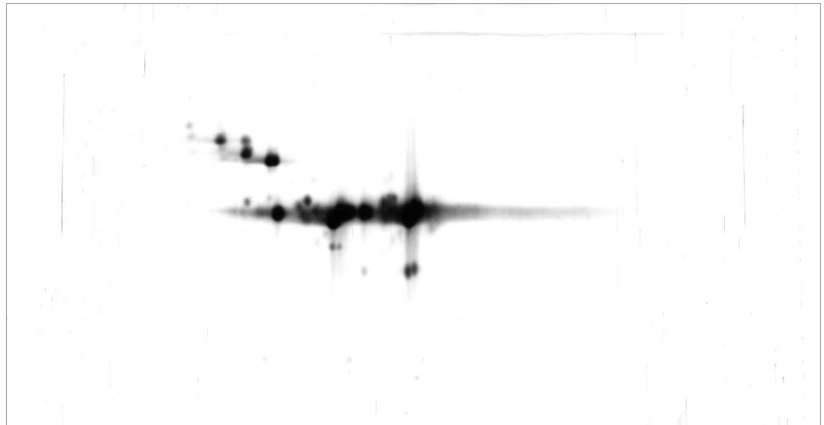
Die drei dargestellten, Gelausschnitten von drei repräsentativen Probenpaaren (1, 2 und 3) zeigen eine sehr deutliche Reduktion der MUPs Expression in R6/2 Mäusen im Alter von 12 Wochen.

Eine stark verminderte Expression von MUPs wurde auch im Urin von R6/2 Mäusen nahe dem Endstadium der Erkrankung gefunden (Abb. 22).

5.2.4.4 Expression von AAT, CTS und MUPs im Krankheitsverlauf

Im Krankheitsverlauf unterschied sich die Expression AAT, CTS und MUPs zwischen R6/2 und Kontrollmäusen erst im Alter von 12 nicht jedoch 8 Wochen (Abb. 20 und 21 sowie Tab. 9 und 10).

R6/2



Kontrolle

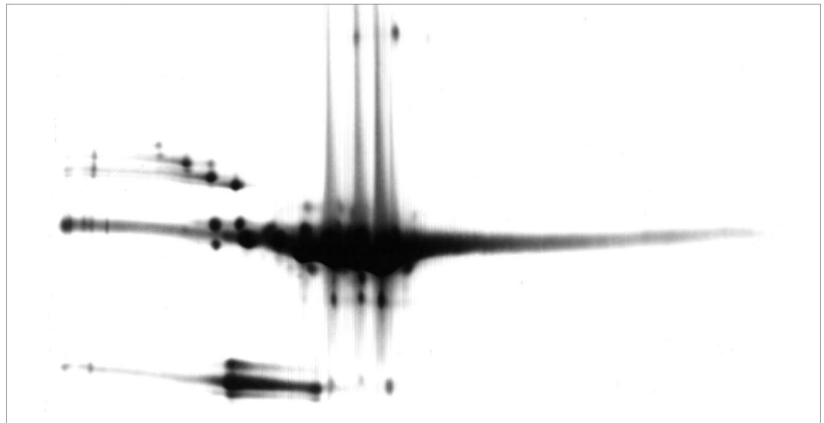


Abb. 22: Stark reduzierte MUPs Expression im Urin von R6/2 Mäusen nahe dem Endstadium der Erkrankung

Ein repräsentatives Beispiel eines Gelausschnitts einer Urinprobe von zwölf Wochen alten R6/2 und Kontrollmäusen. Im Gegensatz zum Kontrolle wurde das R6/2 Gel bis zum Sichtbarwerden des Hintergrunds gefärbt, da keine Referenzspots, welche bei R6/2 und Kontrolle gleich exprimiert wurden als Anhaltspunkt für eine identische Färbung vorhanden waren.

5.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Untersuchung verschiedener Gewebe

Bei dieser Arbeit wurde Gewebe aus den drei Keimblättern, Ektoderm (Gehirn), Mesoderm (Herz und Testes) und Endoderm (Leber) untersucht. Eine wichtige Erkenntnis der Untersuchung dieser Gewebe ist, dass die AAT 1-5 Expression im Gehirn im Gegensatz zu den anderen drei Organen schon im Alter von acht und nicht erst mit zwölf Wochen signifikant erniedrigt war (Tab. 9A). Die Abnahme von CTS nahe dem Endstadium der Erkrankung (zwölf Wochen) ist im Gehirn und bei den Testes geringer als bei der Leber und im Herzen (Tab. 10A und Daten nicht gezeigt (Gehirn)). ABC war im Gehirn und Herzen und nicht in den Testes und der Leber nachweisbar (Tab. 8A) und nur im Gehirn von R6/2 Mäusen vermindert exprimiert (Tab. 6, Abb. 7, 9 und 11 vs. Abb. 18). Die Expression von AAT, CTS und MUPs ist bei männlichen viel höher als bei weiblichen Mäusen. Die Untersuchungen wurden deswegen an männlichen Mäusen durchgeführt. Es konnte somit eine Expressionsabnahme von Proteinen aus drei verschiedenen Proteinfamilien beobachtet werden – zwei SERPINE (AAT und CTS), ein Chaperon (ABC) und ein zur Lipocalinfamilie gehöriges Protein (MUPs, [105]). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse für Gewebe von zwölf Wochen alten Mäusen zeigt Tab. 11.

Tab. 11: Zusammenstellung des Expressionsniveaus von Proteinen, welche HD-spezifisch verändert wurden nahe dem Endstadium der Erkrankung^[a]

| Gewebe | Gehirn | Herz | Leber | Testes |
|--------------------|------------------|------|-------|--------|
| AAT ^[b] | _ ^[c] | - | - | (+) |
| CTS | nein | + | - | + |
| ABC | + | +++ | nein | nein |
| MUPs | nein | nein | + | nein |

^[a]Mäuse im Alter von 12 Wochen; ^[b]die Anzahl der AAT Spots unterschied sich zwischen den Geweben; AAT und CTS Spots wurden in Gehirn, Leber auf der Organebene nur bei männlichen Mäusen gefunden; ^[c] Zeichenerklärung: +++ = Spot(s) ist (sind) im Gel nachweisbar (Spotintensität(en) wie bei 12 Wochen alten Kontrollmäusen); ++ = Spot(s) ist (sind) nachweisbar, aber die Expression ist reduziert; + = Spot(s) ist (sind) nachweisbar aber die Intensität stark reduziert; (+) = Spot(s) ist (sind) kaum nachweisbar; - = Spot(s) ist (sind) nicht nachweisbar; **nein** = Spot(s) wurde(n) in diesem Gewebe nicht gefunden.

6 Diskussion

Beim Vergleich des Proteoms von HD Exon 1 transgenen Mäusen und Kontrollmäusen traten nahe dem Endstadium der Erkrankung nur wenige, aber krankheitsspezifische Unterschiede im Proteinmuster auf. Der größte Teil der exprimierten Proteine war identisch. Mit Hilfe der gefundenen Expressionsunterschiede konnte zum ersten Mal auf Proteinebene gezeigt werden, dass AAT und ABC in ihrer Expression im Gehirn eines Mausmodells für HD während des Krankheitsverlaufs abnehmen. Nahe dem Endstadium der Erkrankung sinkt die Expression von AAT bis unterhalb der Nachweisgrenze einer Silberfärbung von 2 ng ab. Die ABC Expression ist zu diesem Zeitpunkt im Gehirn stark reduziert. Ein weiteres SERPIN, CTS, war in einigen Probenpaaren nahe dem Endstadium im Expressionsniveau erniedrigt. Die Untersuchung der Organe Herz, Testes und Leber zeigte, dass das Expressionsniveau von AAT und im Gegensatz zum Gehirn, CTS, nahe dem Endstadium der Erkrankung stark vermindert ist. Die AAT Expression im Gehirn war im Gegensatz zu den anderen untersuchten Geweben schon im Alter von 8 und nicht erst mit 12 Wochen deutlich erniedrigt. Außer den drei genannten Proteinen war bei HD Mäusen ein weiteres Protein betroffen, MUPs. Die Herunterregulierung des leberspezifischen MUPs Proteins deutet darauf hin, dass zumindest im Mausmodell das Huntingtin Transgen auch die Expression von Proteinen beeinflusst, die im Gehirn nicht vorkommen. Untersuchungen am Menschen mit HD wurden für verschiedene Gehirnregionen durchgeführt (Striatum, der Parietallappen und der vordere Gyrus Cinguli). Ein für Huntington's Chorea charakteristisches abnormes Spot Muster, welches dem Protein AAT zugeordnet werden konnte, wurde in drei Postmortem Gehirnregionen festgestellt. Diese Beobachtung bildet den Brückenschlag zwischen dem Mausmodell und der Erkrankung beim Menschen.

6.1 Verhinderung von Zelltod durch AAT

6.1.1 Aufgabe von AAT im Organismus

AAT ist ein Protein, das hauptsächlich in der Leber produziert wird und bei der Akutphasenantwort mitwirkt [106], d. h. es wird in dem Bestreben sekretiert, bleibenden Gewebeschaden nach Beschädigung des Gewebes zu vermeiden [106]. Im Gehirn wird

AAT hauptsächlich von Astrozyten produziert [107].

6.1.2 Charakterisierung und Bewertung der AAT Expression bei HD bei Maus und Mensch

AAT nimmt in der Expression bei Maus und Mensch während des Krankheitsverlaufes ab.

6.1.2.1 Maus

Gestützt auf die Literaturdaten über das Fortschreiten der Erkrankung [22, 60, 61], scheint die Abnahme von AAT im Alter von acht Wochen (Abb. 10 und Tab. 6) im Gehirn ein späterer Vorgang zu sein, welcher mit einer Zunahme des Schweregrades der Erkrankung einhergeht. Die Anzahl der unterschiedlich stark exprimierten AAT Spots und der Gesamtanzahl der AAT Spots (unterschiedlich/gesamt) unterscheidet sich in Gehirn (3/3), Leber (5/7), Testes (7/7) und Herz (7/7) und es scheinen im Mausmodell mehrere Isoformen beteiligt zu sein (AAT 1-4 und AAT 1-5). Trotz der unterschiedlichen Zahl der exprimierten Spots ist festzustellen, dass die Expression von allen Isoformen und Spots im Verlauf der Erkrankung abnimmt. Die Abnahme der Expression des SERPINS CTS könnte, da es mit AAT zumindest eine gemeinsame Spezifität besitzt [108] und eine 44 %ige Sequenzidentität aufweist [109], die gleichen Ursachen haben wie die von AAT.

6.1.2.2 Mensch

Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass sich die AAT Expression im Striatum und dem Parietallappen zwischen postmortem HD-, im Endstadium der Erkrankung, und Kontrollgehirnen unterschied (Abb. 12). Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, dass bei HD, mit fortschreitender Erkrankung, vor allem das Striatum von einem Verlust an Neuronen und Atrophie betroffen ist [54, 110]. Die Untersuchung eines früheren Stadiums der Erkrankung könnte nun Aufschluss über den zeitlichen Verlauf der Erkrankung geben. Ein frühes Stadium der Erkrankung kann durch den vorderen Gyrus Cinguli simuliert werden. Es hat sich gezeigt, dass dieser selbst bei Grad 3 und 4 Gehirnen (Tab. 7) nach makroskopischer Begutachtung (Untersuchung durchgeführt am: Harvard Brain Tissue Resource Center) morphologisch nicht von Atrophie betroffen war. Er bildet somit ein Modell für mögliche pathologische Veränderungen, die bei der Proteinexpression vor allem im Striatum zu Beginn der Erkrankung auftreten. Es konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass nur zwei von vier der untersuchten vorderen Gyrus Cinguli

Probenpaare ein verändertes AAT Expressionsmuster wie im Striatum aufwiesen (Abb. 12, Abb. 13 und Tab. 7). Dies deutet darauf hin, dass die Expressionsveränderung von AAT mit stärkerer Ausprägung der Erkrankung im Gewebe zunimmt. Der Rückgriff auf ein Modell wurde notwendig, da Gehirngewebe aus frühen Stadien der Erkrankung beim Menschen selten und schwer zugänglich ist, sodass eine ausreichende Probenanzahl nicht gewährleistet werden konnte.

6.1.3 Differentielle Expression unterschiedlicher AAT Varianten bei Mensch und Maus

6.1.3.1 Zwei Proteinisoformen von AAT bei Maus und Mensch repräsentieren zwei Zustände im gleichen Prozess

AAT wurde in der Maus und im Menschen mit unterschiedlichem pI und Molekulargewicht identifiziert. Das bei der Maus differentiell exprimierte AAT besitzt ein Molekulargewicht von 61 kDa. Es handelt sich wahrscheinlich um die unprozessierte Form des Proteins mit 46 kDa und 413 Aminosäuren. Die Ursache für das um 15 kDa erhöhte Molekulargewicht in der SDS-PAGE ist wahrscheinlich die globuläre Konformation von AAT. Diese Konformation führt zu einer verminderten Bindung von SDS und demzufolge zu einer geringeren Mobilität bei der SDS PAGE [111]. Das sechs AAT-Spots umfassende Muster beim Menschen besitzt einen um 0,6 pH Einheiten niedrigeren pI Wert und ein ungefähr um 20 kDa geringeres Molekulargewicht. Selbst die Entfernung der angenommenen Signalsequenz bei AAT, welche aus den Aminosäuren 1 – 24 besteht, durch Prozessierung des Proteins, würde nur zu einer geringfügigen Molekulargewichtsverminderung des Proteins auf 43 kDa und keiner signifikanten pI-Wert Änderung führen [103]. Die für die geringere SDS Bindung verantwortliche Proteinstrukturelemente würden durch die Abtrennung der Signalsequenz somit wahrscheinlich kaum oder gar nicht verändert, sodass die beobachtete Masse von ca. 60 kDa ungefähr gleich bleiben sollte. Die Erklärung für das in der PAGE beobachtete Molekulargewicht von 40 kDa muss also eine andere sein. Es ist in der Literatur bereits beschrieben worden, dass AAT in Gegenwart von Heparin und Glukose gespalten wird. Das Protein Fragment, welches nach der Spaltung auftrat, hatte ein Molekulargewicht von 45 kDa (durch SDS-PAGE bestimmt) [112] was im Bereich des gefundenen 40 kDa Proteins liegt. Beim Menschen könnte also eine Prozessierung oder Abbau von AAT durch

Proteasen im Verlauf der Erkrankung stattfinden, deren genauer Mechanismus jedoch unbekannt ist. Obwohl das Spotmuster von AAT sich bei der Erkrankung beim Menschen und dem R6/2 Mausmodell unterschieden, bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass bei den beiden Spezies AAT auf unterschiedliche Weise wirkt. Aufgrund des unterschiedlichen Zeitrahmens, in dem die Erkrankung bei den beiden Spezies abläuft (Maus 8 Wochen; Mensch 10 bis 15 Jahre), könnte sich die Kinetik der AAT Expression unterscheiden. Es besteht die Möglichkeit, dass die 61 kDa Isoform beim Menschen, aufgrund einer langsameren AAT Abnahme, unverändert hoch exprimiert wird. Die beim Menschen gefundene kleinere AAT Isoform könnte in der kurzen Krankheitsdauer bei der Maus in zu geringen Mengen gebildet werden, damit eine veränderte Expression nachweisbar ist. Das Doppelspotmuster wurde auch bei einer Kontrolle (B3813) des vorderen Gyrus Cinguli gefunden. Bei dieser Kontrolle wurde eine frische Einblutung im zerebralen und subarachnoiden Raum und eine moderat akute Enzephalopathie des hypoxisch-ischämischen Typs mit erhöhter GFAP Expression (Abb. 13) diagnostiziert. Es scheint deswegen vorstellbar, dass das Auftreten dieses AAT Musters bei Mäusen und Menschen möglicherweise zu einem allgemeineren Mechanismus des Gehirns gehört, vielleicht eine akutphasenartige Antwort, um mit übermäßigem Stress und Gewebeschädigung fertig zu werden.

6.1.3.2 Gemeinsamer Wirkmechanismus für AAT in humanem und murinem HD trotz unterschiedlicher Anzahl an AAT Proteinen zwischen den Spezies

Im Gegensatz zu einem einzelnen menschlichen AAT Gen wurde gezeigt, dass Mäuse, die zur Spezies *Mus Musculus* gehören, mindestens fünf Gene besitzen [113]. In C57Bl/6 Mäusen befinden sich sowohl zwei „orthodoxe“ Gene, mit dem Menschen gleichender Aminosäuresequenz im reaktiven Zentrum, als auch drei „unorthodoxe“ Gene mit abweichender Sequenz, auf Chromosome 12. Das reaktive Zentrum eines SERPINS ist die Region wo die Serinprotease zwischen der variablen Aminosäure an Position P1' und dem konservierten Serin an Position P1 schneidet, bevor sie einen unauflöslchen, hemmenden Komplex mit dem SERPIN formen kann [113, 114]. Die Aminosäure an Position P1' variiert zwischen Methionin (einzige beim Menschen an dieser Position vorkommende Aminosäure, darum „orthodox“) Thyrosin oder Leuzin (beide nicht menschähnlich, deshalb nicht orthodox) [113]. Die in der Studie gefundenen AAT Varianten, AAT 1-4 und

AAT 1-5, gehören zu Genprodukten der unorthodoxen Gene. Die abweichenden Sequenzen im reaktiven Zentrum lassen vermuten, dass es Unterschiede in der Proteasespezifität zwischen dem menschlichen und dem murinen AAT geben könnte [115] und die Proteine an zwei unterschiedlichen Prozessen in HD beteiligt sind. Es gibt jedoch Anhaltspunkte, dass dies nicht so ist. In der vorliegenden Studie wurde, neben AAT, die Verminderung der Expression eines weiteren SERPINS, CTS, in vier Geweben von R6/2 (Gehirn, Herz, Testes und Leber) nachgewiesen. Die verminderte Expression von zwei verschiedenen SERPINEN, wie AAT und CTS deutet darauf hin, dass eine sich überschneidende hemmende Aktivität oder ein anderer, beiden SERPINEN gemeinsamer Mechanismus im pathologischen Prozess von HD gestört ist, der nicht an eine bestimmte SERPIN Spezifität im reaktiven Zentrum gebunden ist. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass beide Inhibitoren ein gemeinsames hemmendes Potential gegenüber einer Protease, Trypsin, aber nicht anderen Proteasen, Elastase aus dem Schwein, Trypsin aus dem Rind und Chymotrypsin, besitzen [108]. Dies könnte auch auf humanes und murines AAT zutreffen.

6.1.4 Mechanismus der Zelltodhemmung durch AAT

Nachdem nun nachgewiesen werden konnte, dass die Expression von AAT bei HD sich im Verlauf der Erkrankung ändert war es interessant zu untersuchen welche Rolle AAT bei der Erkrankung spielen könnte. AAT wurde bereits mit der Pathologie von Alzheimer, eine weitere schwerwiegende, neurodegenerative Erkrankung, in Zusammenhang gebracht. Es kommt in senilen Plaques vor und schützt vor der Toxizität von amyloiden Peptiden [107, 116]. AAT schützt die Tumorzelllinie I5, welche aus Inselzellen des Pankreas der Ratte hervorgegangen ist, in Gegenwart der Peptide A β ₁₋₄₂, A β ₁₋₄₀ und A β ₂₅₋₃₅, deren fehlgeleitete Generierung bei Alzheimer toxisch wirkt, vor Zelltod. Zur Aufrechterhaltung der Schutzfunktion war die protease-hemmende Wirkung wichtig [116]. Die Zelltod-hemmende Wirkung von AAT könnte darauf beruhen, dass dieses den Abbau der extrazellulären Matrix (gezeigt bei vaskulären, glatten Muskelzellen) hemmt. Dies wiederum verhindert die Aktivierung von Kaspasen und verringert so den Zelltod [117]. Es gibt noch weitere Hinweise, dass bei der Zelltodverhinderung durch AAT, die indirekte Hemmung von Kaspasen, die bei Apoptose eine wichtige Funktion haben [24], eine Rolle spielt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen von AAT, die Aktivierung der Kaspasen 1 und 3 in einem Ischämie/Reperfusions-Experiment in der

Niere [118] und Kaspasen 3 und 7 bei einem experimentell mit D-(+)-Galaktosamine induzierten Hepatitis Modell [119], hemmen konnten. Die Kaspasen 1 und 3 waren im Gehirn von R6/2 Mäusen im Alter von 7 Wochen hochreguliert [44], ungefähr zu einem Zeitpunkt, bei dem die AAT Expression bei R6/2 Mäusen abnimmt (Abb. 10 und Tab. 6). Auch der Gewichtsverlust beim Gehirn von R6/2 Mäusen [33] begann ungefähr zur gleichen Zeit wie die verminderte AAT Expression (Abb. 10 und Tab. 6). AAT kann nicht direkt „upstream“ oder „downstream“ von Prokaspase 3 oder 7 wirken, da das Protein kein hemmendes Potential für rekombinante Kaspasen besitzt und auch keine hemmende Wirkung bei TNF Zytotoxizitätsassays zeigte [120]. Die Relevanz der Kaspasehemmung bei HD wird dadurch unterstrichen, dass Kaspasen in R6/2 Gehirnen differentiell reguliert sind [44, 53]. In HD Gehirnen wurden Anzeichen für apoptosetypische DNA Fragmentierung gefunden [47, 48]. Huntingtin mit einer pathologischen Anzahl von Glutaminwiederholungen verursacht Apoptose „in vitro“ [36]. Bis jetzt gibt es jedoch noch keine „in vivo“ Daten, welche dies für HD im Mausmodell oder beim Menschen bestätigen [23] (siehe auch 1.3). Außerdem wurde bereits in einer Studie festgestellt, dass Neuronen sowohl in R6/2 Mäusen als auch in „juvenile Onset“ HD Fällen an einer weder Nekrose noch Apoptose zuzuordnende Art von Zelltod sterben [23].

6.2 Verminderte ABC Expression im Verlauf der Erkrankung

In der vorliegenden Untersuchung geht die stark verringerte ABC Expression im Alter von acht Wochen (Abb. 11 und Tab. 6) mit dem verstärkten Auftreten von neuropilen Aggregaten bei R6/2 Mäusen einher [22]. Es ist interessant, dass diese Verminderung von ABC im Gehirn, nicht aber im Herzen beobachtet werden konnte (Abb. 11 und Tab. 6 vs. Abb. 18). Dies könnte einerseits damit zusammenhängen, dass der Verlauf der Erkrankung in verschiedenen Organen unterschiedlich ist oder dass der Expressionslevel von ABC im Herzen viel höher als im Gehirn ist (Abb. 18 vs. Abb. 7 und 11). Abb. 18 zeigt jedoch nicht zu unterscheidende Spotintensitäten bei drei repräsentativen Probenpaaren im Herzen bei R6/2 und Kontrolle. Die Intensitäten der umgebenden Spots zeigen auch keine Unterschiede, sodass die organspezifische Abnahme der Expression sehr viel wahrscheinlicher ist. Es konnte auch bereits gezeigt werden, dass die Konzentration von ABC bei kardiovaskulären Erkrankungen im Herzen ansteigt und es möglicherweise zu schnellen posttranslationalen Modifizierung kommt [121]. Da Erkrankungen im

Allgemeinen Stress für das betroffene Gewebe bedeuten, ist es möglich, dass auch bei Gehirnerkrankungen die Expression von ABC aufgrund des Stresses ursprünglich ansteigt, das Protein in seinem Bestreben Aggregation zu verhindern, jedoch von den gebildeten Aggregaten weggefangen wird. Die sich unterscheidende ABC Isoform konnte nicht in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Sie wurde im Gehirn (Abb. 7, 11, Tab. 6 und 9 A) und Herzen, aber nicht in Milz, Leber und Testes gefunden (Tab. 8A und 9 A). Der Unterschied im isoelektrischen Punkt von 0,6 pH-Einheiten zum berechneten Wert wurde bereits bei humanem Myokardiumgewebe aus dem Atrium [102] mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese gefunden. Diese Werte wurden mit der gleichen Methode in myokardialen Proteinen aus der Ratte bestätigt [122]. Auch das gefundene Molekulargewicht von ungefähr 22 kDa wurde in diesen Studien bestätigt. Die pI-Veränderung könnte aufgrund einer posttranslationalen Modifikation mit einer Ladungsveränderung (z. B. Phosphorylierung) zustande gekommen sein. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass ABC als Chaperon [123] fungiert und durch Hitze und andere Stressfaktoren induziert werden kann. Dies geschieht, um die Hitzetoleranz von Zellen zu erhöhen, wie das auch andere Proteine, die zur Gruppe der kleinen Hsp gehören, vermögen [124]. Auf mRNA Ebene wird ABC in vielen verschiedenen Geweben exprimiert [125]. Im gesunden Gehirn wird ABC von Zellen in den tieferen Schichten der weißen Materie exprimiert [85]. Nach TNF- α Stimulation von humanen Astrozyten ist eine Expression von ABC zu beobachten [126]. Eine Hochregulation der Expression von ABC wurde auch bei pathologischen Veränderungen, wie z.B. Gehirntumoren, gefunden [127]. ABC wurde aufgrund seiner „Entwirrungseigenschaften“ mit der frühen Abwehr gegenüber beschädigten oder in Unordnung geratenen intermediäre Filamenten, welche zur Bildung von Inklusionen führen können, in Zusammenhang gebracht [82]. Es könnte möglich sein, dass dieses Protein dafür verantwortlich ist, Proteine wie das N-terminale Fragment von Huntingtin von der Präzipitation in intranukleäre, neuronale Einschlüsse abzuhalten [22, 31, 33]. Der Mangel an ausreichend ABC, welcher spätestens ab dem Alter von 8 Wochen bei R6/2 Mäusen im Gehirn auftrat (Abb. 11 und Tab. 6), könnte aus diesem Grund zur vermehrten Bildung von Aggregaten beitragen wie dieser bei R6/2 Mäusen ab dem Alter von ungefähr vier Wochen beobachtet wurde [22, 33]. Dieser Mangel könnte auf einen schnelleren Verbrauch von ABC durch die Aggregate und/oder eine geringere Expression bei erhöhtem Schweregrad der Erkrankung, zurückzuführen sein. Bei anderen, kleinen Hsp, wie zum Beispiel Hsp 70 und Hsp 40 konnte bereits gezeigt werden, dass sie das

Auftreten von fibrillären Strukturen, gebildet durch Htt, hemmen [83]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie mit den kleinen Hsp Hsp40, Hsp70 und NSF (n-ethylmaleimide sensitive factor) zeigt, dass diese kleinen Hsp Kaspase 3 und 9 hemmen, obwohl nur Hsp40 die Bildung von Aggregaten signifikant inhibierte [128]. Ein kaspasehemmendes Potential wurde auch bei AAT gefunden, was einen möglichen synergistischen Effekt beider Proteine bei der Verhinderung von Zelltod bei HD nahe legt [118, 120].

6.3 Veränderte MUPs Expression bei transgenen R6/2 Mäusen

Die Expression einer Gruppe von Isoformen eines Proteins, die Major Urinary Proteins (MUPs), von denen kein homologes Protein beim Menschen bekannt ist, war in der Leber (Abb. 21 und Tab. 9B) und im Urin (Abb. 22) von Mäusen im Alter von 12 Wochen stark reduziert. Es ist bereits bekannt, dass dieses Protein leberspezifisch exprimiert wird [129]. Die Expression ist in männlichen beträchtlich höher als in weiblichen Mäusen [130]. Die Proteinisoformen von MUPs haben ein Molekulargewicht von ungefähr 20 kDa, und bilden eine β -Barrel Struktur aus, welche einen hydrophoben Hohlraum umschließt [131]. Dieser Hohlraum dient zum Beispiel als Bindungsstelle für 3,4-Dehydro-Exo-Brevicomin und 2-Sec-Butyl-4,5-Dihydrothiazole [132]. Das Binden an MUPs erlaubt es diesen leicht flüchtigen Liganden, über einen längeren Zeitraum von getrocknetem Urin freigesetzt zu werden [132]. Die Freisetzung dieser Liganden vermittelt den Aggressivitätsstatus eines Männchens an andere Männchen [133] und stimuliert den Eisprung bei Weibchen [134]. Daraus lässt sich ableiten, dass R6/2 Männchen nahe dem Endstadium der Erkrankung nicht länger die Aufmerksamkeit von Weibchen durch Duftmarken auf sich ziehen können, was ihren Erfolg bei der Reproduktion zusätzlich zur Testesatrophie [63] stark vermindert [41]. Erkennung der Individualität bei Mäusen scheint auch vom Vorhandensein der MUPs Proteine abzuhängen, so dass eine Verringerung in der Konzentration dieser Proteine im Urin das Sozialverhalten der Mäuse beeinträchtigen könnte [133]. Es ist bereits bekannt, dass das Gewicht der Testes in transgenen Mäusen beginnt ab dem Alter von ca. acht Wochen abzunehmen [63], was ungefähr mit dem Beginn der Abnahme der MUPs Konzentration im Urin zusammenfällt. Es konnte bereits bei Ratten gezeigt werden, dass die MUPs-Expression, bei einem experimentellen Modell für Schlaganfall, herunterreguliert war [135]. Dies könnte bedeuten, dass dieses Protein empfindlich gegenüber vielfältigen krankhaften Veränderungen bei Mäusen und Ratten ist und dafür

sorgt, dass sich kranke Tiere nicht weiter vermehren können. MUPs ist leicht für die Analyse durch Urinprobenentnahme zugänglich. Aus diesem Grund könnten dieses Protein als Marker bei R6/2 Mäusen verwendet werden, um pharmakologische Substanzen auf ihre Wirksamkeit für die Behandlung von HD zu screenen.

7 Zusammenfassung

Die bei dieser Arbeit verwendete Proteomanalyse bot die Möglichkeit, Tausende von Proteinen von verschiedenen Organen parallel zu untersuchen. Mit Hilfe dieses breit angelegten Ansatzes konnten vier bei HD differentiell exprimierte Proteine aus sehr unterschiedlichen Familien in einem Mausmodell identifiziert und deren Expressionsmuster zeitlich aufgelöst werden. Bei den Proteinen handelt es sich um AAT und CTS, beides SERPINE, ABC, ein Chaperon und Mitglied der Familie der kleinen Hsp sowie MUPs, ein Lipocalin. Die Expressionsabnahme von AAT, CTS und ABC im Gehirn während des Krankheitsverlauf weist darauf hin, dass die Aufrechterhaltung der normalen Konzentration der Proteine möglicherweise den Zelltod von Gehirnzellen verringern und damit nützlich bei der Verzögerung des Fortschreitens der Erkrankung sein könnte. Unterstützt wird die Hypothese dadurch, dass bereits gezeigt werden konnte, dass sowohl SERPINE als auch Chaperone bei der Verminderung von Zelltod in neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Die gleichzeitige Abnahme der Konzentration von AAT und CTS lässt auf einen krankheitsrelevanten Prozess bei HD schließen, an dem mehrere SERPINE, mit vielleicht nur teilweise überlappenden Spezifitäten beteiligt sind. Die unterschiedliche Expression von MUPs bei R6/2 Mäusen kann als leicht zugänglicher, klinischer Marker für das Fortschreiten von HD bei diesen Tieren zum Screenen nach wirksamen Medikamenten Anwendung finden. Nach Verwendung eines Mausmodells zur Charakterisierung des HD Proteoms konnte eine gezielte Suche nach den bei der Maus gefundenen, HD spezifischen, Unterschieden im Proteom von menschlichen HD Gehirnregionen gestartet und für ein Protein, AAT, erfolgreich abgeschlossen werden. Es konnte also gezeigt werden, dass es sinnvoll ist, Mausmodelle für die Untersuchung von Krankheiten beim Mensch im Rahmen einer Proteomics Studie zu verwenden. Generell kommt es im Anschluss an die Proteomuntersuchung darauf an, die gefundenen, krankheitsrelevanten Proteine, hinsichtlich ihrer Wirkungsweise im Krankheitsprozess biochemisch und genetisch genauer zu untersuchen. Hier stößt die biochemische und genetische Charakterisierung jedoch an Grenzen, weil für die meisten Proteine die normalen Funktionen nicht bekannt sind, geschweige denn die Stoffwechselwege in die diese integriert sind.

Literaturverzeichnis

- [1] McMurray, S. E. und McMurray, C. T. (2001): Huntington's disease. A sports star and a cook, Lancet (Band 358 Suppl), Seite S38.
- [2] Neurodegeneration, Definition. URL: <http://www.hon.ch/cgi-bin/HONselect?search>
- [3] Price, D. L. und Sisodia, S. S. (1998): Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models, Annu Rev Neurosci (Band 21), Seite 479-505.
- [4] Olanow, C. W. und Tatton, W. G. (1999): Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease, Annu Rev Neurosci (Band 22), Seite 123-44.
- [5] Gusella, J. F. und MacDonald, M. E. (1996): Trinucleotide instability: a repeating theme in human inherited disorders, Annu Rev Med (Band 47), Seite 201-9.
- [6] Zoghbi, H. Y. und Orr, H. T. (2000): Glutamine repeats and neurodegeneration, Annu Rev Neurosci (Band 23), Seite 217-47.
- [7] Harper, P. S. (1991): Huntington's Disease, W. B. Saunders, London.
- [8] Telenius, H.; Kremer, H. P.; Theilmann, J.; Andrew, S. E.; Almqvist, E.; Anvret, M.; Greenberg, C.; Greenberg, J.; Lucotte, G.; Squitieri, F. und et al. (1993): Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG)_n repeat length is the sex of the affected parent, Hum Mol Genet (Band 2), Nr. 10, Seite 1535-40.
- [9] HDCRG (1993): A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group, Cell (Band 72), Nr. 6, Seite 971-83.
- [10] McMurray, C. T. (2001): Huntington's disease. Expanding horizons for treatment, Lancet (Band 358 Suppl), Seite S37.
- [11] Wanker, E. E. (2000): Protein aggregation and pathogenesis of Huntington's disease: mechanisms and correlations, Biol Chem (Band 381), Nr. 9-10, Seite 937-42.
- [12] Sharp, A. H. und Ross, C. A. (1996): Neurobiology of Huntington's disease, Neurobiol Dis (Band 3), Nr. 1, Seite 3-15.
- [13] Li, H.; Li, S. H.; Johnston, H.; Shelbourne, P. F. und Li, X. J. (2000): Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity, Nat Genet (Band 25), Nr. 4, Seite 385-9.
- [14] Velier, J.; Kim, M.; Schwarz, C.; Kim, T. W.; Sapp, E.; Chase, K.; Aronin, N. und DiFiglia, M. (1998): Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways, Exp Neurol (Band 152), Nr. 1,

- [15] Zuccato, C.; Ciammola, A.; Rigamonti, D.; Leavitt, B. R.; Goffredo, D.; Conti, L.; MacDonald, M. E.; Friedlander, R. M.; Silani, V.; Hayden, M. R.; Timmusk, T.; Sipione, S. und Cattaneo, E. (2001): Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease, *Science* (Band 293), Nr. 5529, Seite 493-8.
- [16] Bates, G. P. (2001): Huntington's disease. Exploiting expression, *Nature* (Band 413), Nr. 6857, Seite 691, 693-4.
- [17] Steffan, J. S.; Bodai, L.; Pallos, J.; Poelman, M.; McCampbell, A.; Apostol, B. L.; Kazantsev, A.; Schmidt, E.; Zhu, Y. Z.; Greenwald, M.; Kurokawa, R.; Housman, D. E.; Jackson, G. R.; Marsh, J. L. und Thompson, L. M. (2001): Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*, *Nature* (Band 413), Nr. 6857, Seite 739-43.
- [18] McCampbell, A.; Taye, A. A.; Whitty, L.; Penney, E.; Steffan, J. S. und Fischbeck, K. H. (2001): Histone deacetylase inhibitors reduce polyglutamine toxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 26, Seite 15179-84. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/98/26/15179>
- [19] Peters, P. J.; Ning, K.; Palacios, F.; Boshans, R. L.; Kazantsev, A.; Thompson, L. M.; Woodman, B.; Bates, G. P. und D'Souza-Schorey, C. (2002): Arfaptin 2 regulates the aggregation of mutant huntingtin protein, *Nat Cell Biol* (Band 4), Nr. 3, Seite 240-5.
- [20] Gervais, F. G.; Singaraja, R.; Xanthoudakis, S.; Gutekunst, C. A.; Leavitt, B. R.; Metzler, M.; Hackam, A. S.; Tam, J.; Vaillancourt, J. P.; Houtzager, V.; Rasper, D. M.; Roy, S.; Hayden, M. R. und Nicholson, D. W. (2002): Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi, *Nat Cell Biol* (Band 4), Nr. 2, Seite 95-105.
- [21] Mattson, M. P. (2000): Apoptosis in neurodegenerative disorders, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 1), Nr. 2, Seite 120-9.
- [22] Li, H.; Li, S. H.; Cheng, A. L.; Mangiarini, L.; Bates, G. P. und Li, X. J. (1999): Ultrastructural localization and progressive formation of neuropil aggregates in Huntington's disease transgenic mice, *Hum Mol Genet* (Band 8), Nr. 7, Seite 1227-36.
- [23] Turmaine, M.; Raza, A.; Mahal, A.; Mangiarini, L.; Bates, G. P. und Davies, S. W. (2000): Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 97), Nr. 14, Seite 8093-7.
- [24] Earnshaw, W. C.; Martins, L. M. und Kaufmann, S. H. (1999): Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annu Rev Biochem* (Band 68), Seite 383-424.
- [25] Lansbury, P. T., Jr. (1997): Structural neurology: are seeds at the root of neuronal degeneration?, *Neuron* (Band 19), Nr. 6, Seite 1151-4.

- [26] Lin, X.; Cummings, C. J. und Zoghbi, H. Y. (1999): Expanding our understanding of polyglutamine diseases through mouse models, *Neuron* (Band 24), Nr. 3, Seite 499-502.
- [27] Dyer, R. B. und McMurray, C. T. (2001): Mutant protein in Huntington disease is resistant to proteolysis in affected brain, *Nat Genet* (Band 29), Nr. 3, Seite 270-8.
- [28] Kim, Y. J.; Yi, Y.; Sapp, E.; Wang, Y.; Cuiffo, B.; Kegel, K. B.; Qin, Z. H.; Aronin, N. und DiFiglia, M. (2001): Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 22, Seite 12784-9. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/98/22/12784>
- [29] Wellington, C. L.; Singaraja, R.; Ellerby, L.; Savill, J.; Roy, S.; Leavitt, B.; Cattaneo, E.; Hackam, A.; Sharp, A.; Thornberry, N.; Nicholson, D. W.; Bredesen, D. E. und Hayden, M. R. (2000): Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 26, Seite 19831-8.
- [30] Wellington, C. L.; Ellerby, L. M.; Hackam, A. S.; Margolis, R. L.; Trifiro, M. A.; Singaraja, R.; McCutcheon, K.; Salvesen, G. S.; Propp, S. S.; Bromm, M.; Rowland, K. J.; Zhang, T.; Rasper, D.; Roy, S.; Thornberry, N.; Pinsky, L.; Kakizuka, A.; Ross, C. A.; Nicholson, D. W.; Bredesen, D. E. und Hayden, M. R. (1998): Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 15, Seite 9158-67.
- [31] DiFiglia, M.; Sapp, E.; Chase, K. O.; Davies, S. W.; Bates, G. P.; Vonsattel, J. P. und Aronin, N. (1997): Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain, *Science* (Band 277), Nr. 5334, Seite 1990-3.
- [32] Gutekunst, C. A.; Li, S. H.; Yi, H.; Mulroy, J. S.; Kuemmerle, S.; Jones, R.; Rye, D.; Ferrante, R. J.; Hersch, S. M. und Li, X. J. (1999): Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology, *J Neurosci* (Band 19), Nr. 7, Seite 2522-34.
- [33] Davies, S. W.; Turmaine, M.; Cozens, B. A.; DiFiglia, M.; Sharp, A. H.; Ross, C. A.; Scherzinger, E.; Wanker, E. E.; Mangiarini, L. und Bates, G. P. (1997): Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation, *Cell* (Band 90), Nr. 3, Seite 537-48.
- [34] Schilling, G.; Becher, M. W.; Sharp, A. H.; Jinnah, H. A.; Duan, K.; Kotzok, J. A.; Slunt, H. H.; Ratovitski, T.; Cooper, J. K.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Price, D. L.; Ross, C. A. und Borchelt, D. R. (1999): Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin, *Hum Mol Genet* (Band 8), Nr. 3, Seite 397-407.

- [35] Mende-Mueller, L. M.; Toneff, T.; Hwang, S. R.; Chesselet, M. F. und Hook, V. Y. (2001): Tissue-specific proteolysis of Huntingtin (htt) in human brain: evidence of enhanced levels of N- and C-terminal htt fragments in Huntington's disease striatum, *J Neurosci* (Band 21), Nr. 6, Seite 1830-7. URL: <http://www.jneurosci.org/cgi/content/abstract/21/6/1830>
- [36] Saudou, F.; Finkbeiner, S.; Devys, D. und Greenberg, M. E. (1998): Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions, *Cell* (Band 95), Nr. 1, Seite 55-66.
- [37] Kim, M.; Lee, H. S.; LaForet, G.; McIntyre, C.; Martin, E. J.; Chang, P.; Kim, T. W.; Williams, M.; Reddy, P. H.; Tagle, D.; Boyce, F. M.; Won, L.; Heller, A.; Aronin, N. und DiFiglia, M. (1999): Mutant huntingtin expression in clonal striatal cells: dissociation of inclusion formation and neuronal survival by caspase inhibition, *J Neurosci* (Band 19), Nr. 3, Seite 964-73. URL: <http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/19/3/964>
- [38] Sanchez, I.; Xu, C. J.; Juo, P.; Kakizaka, A.; Blenis, J. und Yuan, J. (1999): Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats [see comments], *Neuron* (Band 22), Nr. 3, Seite 623-33.
- [39] Huang, E. J. und Reichardt, L. F. (2001): Neurotrophins: roles in neuronal development and function, *Annu Rev Neurosci* (Band 24), Seite 677-736. URL: <http://neuro.annualreviews.org/cgi/content/abstract/24/1/677>
- [40] Cha, J. H.; Kosinski, C. M.; Kerner, J. A.; Alsdorf, S. A.; Mangiarini, L.; Davies, S. W.; Penney, J. B.; Bates, G. P. und Young, A. B. (1998): Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 11, Seite 6480-5.
- [41] Mangiarini, L.; Sathasivam, K.; Seller, M.; Cozens, B.; Harper, A.; Hetherington, C.; Lawton, M.; Trotter, Y.; Lehrach, H.; Davies, S. W. und Bates, G. P. (1996): Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice, *Cell* (Band 87), Nr. 3, Seite 493-506.
- [42] Perez-Severiano, F.; Rios, C. und Segovia, J. (2000): Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease, *Brain Res* (Band 862), Nr. 1-2, Seite 234-7.
- [43] Roy, S. und Nicholson, D. W. (2000): Cross-talk in cell death signaling, *J Exp Med* (Band 192), Nr. 8, Seite F21-5. URL: <http://www.jem.org/cgi/content/full/192/8/F21>
- [44] Chen, M.; Ona, V. O.; Li, M.; Ferrante, R. J.; Fink, K. B.; Zhu, S.; Bian, J.; Guo, L.; Farrell, L. A.; Hersch, S. M.; Hobbs, W.; Vonsattel, J. P.; Cha, J. H. und Friedlander, R. M. (2000): Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease, *Nat Med* (Band 6), Nr. 7, Seite 797-801.

- [45] Ferri, K. F. und Kroemer, G. (2001): Organelle-specific initiation of cell death pathways, *Nat Cell Biol* (Band 3), Nr. 11, Seite E255-63.
- [46] Kroemer, G.; Dallaporta, B. und Resche-Rigon, M. (1998): The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis, *Annu Rev Physiol* (Band 60), Seite 619-42.
- [47] Portera-Cailliau, C.; Hedreen, J. C.; Price, D. L. und Koliatsos, V. E. (1995): Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models, *J Neurosci* (Band 15), Nr. 5 Pt 2, Seite 3775-87.
- [48] Dragunow, M.; Faull, R. L.; Lawlor, P.; Beilharz, E. J.; Singleton, K.; Walker, E. B. und Mee, E. (1995): In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes, *Neuroreport* (Band 6), Nr. 7, Seite 1053-7.
- [49] Mattson, M. P. und Camandola, S. (2001): NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders, *J Clin Invest* (Band 107), Nr. 3, Seite 247-54. URL: <http://www.jci.org/cgi/content/full/107/3/247>
- [50] Sisodia, S. S. (1998): Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial?, *Cell* (Band 95), Nr. 1, Seite 1-4.
- [51] Klement, I. A.; Skinner, P. J.; Kaytor, M. D.; Yi, H.; Hersch, S. M.; Clark, H. B.; Zoghbi, H. Y. und Orr, H. T. (1998): Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice, *Cell* (Band 95), Nr. 1, Seite 41-53.
- [52] Kuemmerle, S.; Gutekunst, C. A.; Klein, A. M.; Li, X. J.; Li, S. H.; Beal, M. F.; Hersch, S. M. und Ferrante, R. J. (1999): Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease, *Ann Neurol* (Band 46), Nr. 6, Seite 842-9.
- [53] Ona, V. O.; Li, M.; Vonsattel, J. P.; Andrews, L. J.; Khan, S. Q.; Chung, W. M.; Frey, A. S.; Menon, A. S.; Li, X. J.; Stieg, P. E.; Yuan, J.; Penney, J. B.; Young, A. B.; Cha, J. H. und Friedlander, R. M. (1999): Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease, *Nature* (Band 399), Nr. 6733, Seite 263-7.
- [54] Vonsattel, J. P.; Myers, R. H.; Stevens, T. J.; Ferrante, R. J.; Bird, E. D. und Richardson, E. P. (1985): Neuropathological classification of Huntington's disease, *J Neuropathol Exp Neurol* (Band 44), Nr. 6, Seite 559-77.
- [55] Trottier, Y.; Lutz, Y.; Stevanin, G.; Imbert, G.; Devys, D.; Cancel, G.; Saudou, F.; Weber, C.; David, G.; Tora, L. und et al. (1995): Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias, *Nature* (Band 378), Nr. 6555, Seite 403-6.
- [56] Chorea, Definition. URL: <http://neuroscript.com/>
- [57] Reddy, P. H.; Williams, M.; Charles, V.; Garrett, L.; Pike-Buchanan, L.; Whetsell, W. O.; Miller, G. und Tagle, D. A. (1998): Behavioural abnormalities and selective

neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA, *Nat Genet* (Band 20), Nr. 2, Seite 198-202.

- [58] Wheeler, V. C.; White, J. K.; Gutekunst, C. A.; Vrbanc, V.; Weaver, M.; Li, X. J.; Li, S. H.; Yi, H.; Vonsattel, J. P.; Gusella, J. F.; Hersch, S.; Auerbach, W.; Joyner, A. L. und MacDonald, M. E. (2000): Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice, *Hum Mol Genet* (Band 9), Nr. 4, Seite 503-13.
- [59] Wheeler, V. C.; Gutekunst, C. A.; Vrbanc, V.; Lebel, L. A.; Schilling, G.; Hersch, S.; Friedlander, R. M.; Gusella, J. F.; Vonsattel, J. P.; Borchelt, D. R. und MacDonald, M. E. (2002): Early phenotypes that presage late-onset neurodegenerative disease allow testing of modifiers in Hdh CAG knock-in mice, *Hum Mol Genet* (Band 11), Nr. 6, Seite 633-640. URL: <http://hmg.oupjournals.org/cgi/content/abstract/11/6/633>
- [60] Carter, R. J.; Lione, L. A.; Humby, T.; Mangiarini, L.; Mahal, A.; Bates, G. P.; Dunnett, S. B. und Morton, A. J. (1999): Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation, *J Neurosci* (Band 19), Nr. 8, Seite 3248-57.
- [61] Lione, L. A.; Carter, R. J.; Hunt, M. J.; Bates, G. P.; Morton, A. J. und Dunnett, S. B. (1999): Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation, *J Neurosci* (Band 19), Nr. 23, Seite 10428-37.
- [62] Murphy, K. P.; Carter, R. J.; Lione, L. A.; Mangiarini, L.; Mahal, A.; Bates, G. P.; Dunnett, S. B. und Morton, A. J. (2000): Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation, *J Neurosci* (Band 20), Nr. 13, Seite 5115-23.
- [63] Sathasivam, K.; Hobbs, C.; Turmaine, M.; Mangiarini, L.; Mahal, A.; Bertaux, F.; Wanker, E. E.; Doherty, P.; Davies, S. W. und Bates, G. P. (1999): Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue, *Hum Mol Genet* (Band 8), Nr. 5, Seite 813-22.
- [64] Reynolds, G. P.; Dalton, C. F.; Tillery, C. L.; Mangiarini, L.; Davies, S. W. und Bates, G. P. (1999): Brain neurotransmitter deficits in mice transgenic for the Huntington's disease mutation, *J Neurochem* (Band 72), Nr. 4, Seite 1773-6.
- [65] Mangiarini, L.; Sathasivam, K.; Mahal, A.; Mott, R.; Seller, M. und Bates, G. P. (1997): Instability of highly expanded CAG repeats in mice transgenic for the Huntington's disease mutation, *Nat Genet* (Band 15), Nr. 2, Seite 197-200.
- [66] Fain, J. N.; Del Mar, N. A.; Meade, C. A.; Reiner, A. und Goldowitz, D. (2001): Abnormalities in the functioning of adipocytes from R6/2 mice that are transgenic for the Huntington's disease mutation, *Hum Mol Genet* (Band 10), Nr. 2, Seite 145-52. URL: <http://hmg.oupjournals.org/cgi/content/abstract/10/2/145>
- [67] Davies, S. W.; Turmaine, M.; Cozens, B. A.; Raza, A. S.; Mahal, A.; Mangiarini,

- L. und Bates, G. P. (1999): From neuronal inclusions to neurodegeneration: neuropathological investigation of a transgenic mouse model of Huntington's disease, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (Band 354), Nr. 1386, Seite 981-9.
- [68] Denovan-Wright, E. M. und Robertson, H. A. (2000): Cannabinoid receptor messenger RNA levels decrease in a subset of neurons of the lateral striatum, cortex and hippocampus of transgenic Huntington's disease mice, *Neuroscience* (Band 98), Nr. 4, Seite 705-13.
- [69] Bibb, J. A.; Yan, Z.; Svenningsson, P.; Snyder, G. L.; Pieribone, V. A.; Horiuchi, A.; Nairn, A. C.; Messer, A. und Greengard, P. (2000): Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 97), Nr. 12, Seite 6809-14.
- [70] Glass, M.; Dragunow, M. und Faull, R. L. (2000): The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease, *Neuroscience* (Band 97), Nr. 3, Seite 505-19.
- [71] Augood, S. J.; Faull, R. L.; Love, D. R. und Emson, P. C. (1996): Reduction in enkephalin and substance P messenger RNA in the striatum of early grade Huntington's disease: a detailed cellular in situ hybridization study, *Neuroscience* (Band 72), Nr. 4, Seite 1023-36.
- [72] Weeks, R. A.; Piccini, P.; Harding, A. E. und Brooks, D. J. (1996): Striatal D1 and D2 dopamine receptor loss in asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease, *Ann Neurol* (Band 40), Nr. 1, Seite 49-54.
- [73] Luthi-Carter, R.; Strand, A.; Peters, N. L.; Solano, S. M.; Hollingsworth, Z. R.; Menon, A. S.; Frey, A. S.; Spektor, B. S.; Penney, E. B.; Schilling, G.; Ross, C. A.; Borchelt, D. R.; Tapscott, S. J.; Young, A. B.; Cha, J. H. und Olson, J. M. (2000): Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease, *Hum Mol Genet* (Band 9), Nr. 9, Seite 1259-71.
- [74] Greengard, P.; Allen, P. B. und Nairn, A. C. (1999): Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade, *Neuron* (Band 23), Nr. 3, Seite 435-47.
- [75] Perez, M. K.; Paulson, H. L.; Pendse, S. J.; Saionz, S. J.; Bonini, N. M. und Pittman, R. N. (1998): Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine- mediated aggregation, *J Cell Biol* (Band 143), Nr. 6, Seite 1457-70.
- [76] Kazantsev, A.; Preisinger, E.; Dranovsky, A.; Goldgaber, D. und Housman, D. (1999): Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 96), Nr. 20, Seite 11404-9. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/96/20/11404>
- [77] Head, M. W. und Goldman, J. E. (2000): Small heat shock proteins, the cytoskeleton, and inclusion body formation, *Neuropathol Appl Neurobiol* (Band 26), Nr. 4, Seite 304-12.

- [78] Cummings, C. J.; Mancini, M. A.; Antalffy, B.; DeFranco, D. B.; Orr, H. T. und Zoghbi, H. Y. (1998): Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1, *Nat Genet* (Band 19), Nr. 2, Seite 148-54.
- [79] Steffan, J. S.; Kazantsev, A.; Spasic-Boskovic, O.; Greenwald, M.; Zhu, Y. Z.; Gohler, H.; Wanker, E. E.; Bates, G. P.; Housman, D. E. und Thompson, L. M. (2000): The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 97), Nr. 12, Seite 6763-8.
- [80] Nucifora, F. C., Jr.; Sasaki, M.; Peters, M. F.; Huang, H.; Cooper, J. K.; Yamada, M.; Takahashi, H.; Tsuji, S.; Troncoso, J.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M. und Ross, C. A. (2001): Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity, *Science* (Band 291), Nr. 5512, Seite 2423-8. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/291/5512/2423>
- [81] Jana, N. R.; Tanaka, M.; Wang, Gh und Nukina, N. (2000): Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity, *Hum Mol Genet* (Band 9), Nr. 13, Seite 2009-18. URL: <http://hmg.oupjournals.org/cgi/content/abstract/9/13/2009>
- [82] Koyama, Y. und Goldman, J. E. (1999): Formation of GFAP cytoplasmic inclusions in astrocytes and their disaggregation by alphaB-crystallin, *Am J Pathol* (Band 154), Nr. 5, Seite 1563-72.
- [83] Muchowski, P. J.; Schaffar, G.; Sittler, A.; Wanker, E. E.; Hayer-Hartl, M. K. und Hartl, F. U. (2000): Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 97), Nr. 14, Seite 7841-6.
- [84] Head, M. W.; Corbin, E. und Goldman, J. E. (1993): Overexpression and abnormal modification of the stress proteins alpha B-crystallin and HSP27 in Alexander disease, *Am J Pathol* (Band 143), Nr. 6, Seite 1743-53.
- [85] Iwaki, T.; Wisniewski, T.; Iwaki, A.; Corbin, E.; Tomokane, N.; Tateishi, J. und Goldman, J. E. (1992): Accumulation of alpha B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions, *Am J Pathol* (Band 140), Nr. 2, Seite 345-56.
- [86] Renkawek, K.; Voorter, C. E.; Bosman, G. J.; van Workum, F. P. und de Jong, W. W. (1994): Expression of alpha B-crystallin in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol (Berl)* (Band 87), Nr. 2, Seite 155-60.
- [87] Swinbanks, D. (1995): Government backs proteome proposal, *Nature* (Band 378), Nr. 6558, Seite 653.
- [88] Klose, J. (1999): Fractionated extraction of total tissue proteins from mouse and human for 2-D electrophoresis, *Methods Mol Biol* (Band 112), Seite 67-85.

- [89] Klose, J. (1999): Large-gel 2-D electrophoresis, *Methods Mol Biol* (Band 112), Seite 147-72.
- [90] Klose, J. und Kobalz, U. (1995): Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, *Electrophoresis* (Band 16), Nr. 6, Seite 1034-59.
- [91] Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1985): Simplified Method For Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels and the mechanism of silver staining, *Electrophoresis* (Band 6), Nr. 3, Seite 103-112.
- [92] Jungblut, P. R. und Seifert, R. (1990): Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alterations in cytosolic protein pattern of HL-60 leukemic cells, *J Biochem Biophys Methods* (Band 21), Nr. 1, Seite 47-58.
- [93] Doherty, N. S.; Littman, B. H.; Reilly, K.; Swindell, A. C.; Buss, J. M. und Anderson, N. L. (1998): Analysis of changes in acute-phase plasma proteins in an acute inflammatory response and in rheumatoid arthritis using two-dimensional gel electrophoresis, *Electrophoresis* (Band 19), Nr. 2, Seite 355-63.
- [94] Scheler, C.; Lamer, S.; Pan, Z.; Li, X. P.; Salnikow, J. und Jungblut, P. (1998): Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS), *Electrophoresis* (Band 19), Nr. 6, Seite 918-27.
- [95] Klose, J.; Nock, C.; Herrmann, M.; Stuhler, K.; Marcus, K.; Bluggel, M.; Krause, E.; Schalkwyk, L. C.; Rastan, S.; Brown, S. D.; Bussow, K.; Himmelbauer, H. und Lehrach, H. (2002): Genetic analysis of the mouse brain proteome, *Nat Genet* (Band 30), Nr. 4, Seite 385-93.
- [96] Gevaert, K.; Verschelde, J. L.; Puype, M.; Van Damme, J.; Goethals, M.; De Boeck, S. und Vandekerckhove, J. (1996): Structural analysis and identification of gel-purified proteins, available in the femtomole range, using a novel computer program for peptide sequence assignment, by matrix-assisted laser desorption ionization-reflectron time-of-flight-mass spectrometry, *Electrophoresis* (Band 17), Nr. 5, Seite 918-24.
- [97] Immler, D.; Gremm, D.; Kirsch, D.; Spengler, B.; Presek, P. und Meyer, H. E. (1998): Identification of phosphorylated proteins from thrombin-activated human platelets isolated by two-dimensional gel electrophoresis by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS), *Electrophoresis* (Band 19), Nr. 6, Seite 1015-23.
- [98] Zhang, W. und Chait, B. T. (2000): ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information, *Anal Chem* (Band 72), Nr. 11, Seite 2482-9.
- [99] Eng, J.; McCormack, A. L. und Yates III, J. R. (1994): An Approach to Correlate

Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database, Journal of the American Society for Mass Spectrometry (Band 5), Seite 976-989.

- [100] Yates, J. R.; Eng, J. K.; McCormack, A. L. und Schieltz, D. (1995): Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database, Anal Chem (Band 67), Nr. 8, Seite 1426-36.
- [101] Yates, J. R.; Eng, J. K. und McCormack, A. L. (1995): Mining genomes: correlating tandem mass spectra of modified and unmodified peptides to sequences in nucleotide databases, Anal Chem (Band 67), Nr. 18, Seite 3202-10.
- [102] Jungblut, P. R.; Zimny-Arndt, U.; Zeindl-Eberhart, E.; Stulik, J.; Koupilova, K.; Pleissner, K. P.; Otto, A.; Muller, E. C.; Sokolowska-Kohler, W.; Grabher, G. und Stoffler, G. (1999): Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases, Electrophoresis (Band 20), Nr. 10, Seite 2100-10.
- [103] Bestimmung, pI. URL: <http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>
- [104] Clissold, P. M. und Bishop, J. O. (1982): Variation in mouse major urinary protein (MUP) genes and the MUP gene products within and between inbred lines, Gene (Band 18), Nr. 3, Seite 211-20.
- [105] Flower, D. R.; North, A. C. und Sansom, C. E. (2000): The lipocalin protein family: structural and sequence overview, Biochim Biophys Acta (Band 1482), Nr. 1-2, Seite 9-24.
- [106] Baumann, H. und Gauldie, J. (1994): The acute phase response, Immunol Today (Band 15), Nr. 2, Seite 74-80.
- [107] Gollin, P. A.; Kalaria, R. N.; Eikelenboom, P.; Rozemuller, A. und Perry, G. (1992): Alpha 1-antitrypsin and alpha 1-antichymotrypsin are in the lesions of Alzheimer's disease, Neuroreport (Band 3), Nr. 2, Seite 201-3.
- [108] Takahara, H. und Sinohara, H. (1982): Mouse plasma trypsin inhibitors. Isolation and characterization of alpha-1-antitrypsin and contrapsin, a novel trypsin inhibitor, J Biol Chem (Band 257), Nr. 5, Seite 2438-46.
- [109] Hill, R. E.; Shaw, P. H.; Boyd, P. A.; Baumann, H. und Hastie, N. D. (1984): Plasma protease inhibitors in mouse and man: divergence within the reactive centre regions, Nature (Band 311), Nr. 5982, Seite 175-7.
- [110] Vonsattel, J. P. und DiFiglia, M. (1998): Huntington disease, J Neuropathol Exp Neurol (Band 57), Nr. 5, Seite 369-84.
- [111] Finotti, P. und Pagetta, A. (1997): Albumin contamination of a purified human alpha 1-antitrypsin preparation does not affect either structural conformation or the electrophoretic mobility of the inhibitor, Clin Chim Acta (Band 264), Nr. 2, Seite 133-48.
- [112] Finotti, P. und de Laureto, P. P. (1997): Differential effects of heparin and glucose

on structural conformation of human alpha1 antitrypsin: evidence for a heparin-induced cleaved form of the inhibitor, Arch Biochem Biophys (Band 347), Nr. 1, Seite 19-29.

- [113] Borriello, F. und Krauter, K. S. (1991): Multiple murine alpha 1-protease inhibitor genes show unusual evolutionary divergence, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 88), Nr. 21, Seite 9417-21.
- [114] Silverman, G. A.; Bird, P. I.; Carrell, R. W.; Church, F. C.; Coughlin, P. B.; Gettins, P. G.; Irving, J. A.; Lomas, D. A.; Luke, C. J.; Moyer, R. W.; Pemberton, P. A.; Remold-O'Donnell, E.; Salvesen, G. S.; Travis, J. und Whisstock, J. C. (2001): The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature, J Biol Chem (Band 276), Nr. 36, Seite 33293-6. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/276/36/33293>
- [115] Goodwin, R. L.; Barbour, K. W. und Berger, F. G. (1997): Expression of the alpha 1-proteinase inhibitor gene family during evolution of the genus Mus, Mol Biol Evol (Band 14), Nr. 4, Seite 420-7.
- [116] Schubert, D. (1997): Serpins inhibit the toxicity of amyloid peptides, Eur J Neurosci (Band 9), Nr. 4, Seite 770-7.
- [117] Ikari, Y.; Mulvihill, E. und Schwartz, S. M. (2001): alpha 1-Proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, and alpha 2-macroglobulin are the antiapoptotic factors of vascular smooth muscle cells, J Biol Chem (Band 276), Nr. 15, Seite 11798-803.
- [118] Daemen, M. A.; Heemskerk, V. H.; van't Veer, C.; Denecker, G.; Wolfs, T. G.; Vandenabeele, P. und Buurman, W. A. (2000): Functional protection by acute phase proteins alpha(1)-acid glycoprotein and alpha(1)-antitrypsin against ischemia/reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation, Circulation (Band 102), Nr. 12, Seite 1420-6.
- [119] Keppler, D.; Lesch, R.; Reutter, W. und Decker, K. (1968): Experimental hepatitis induced by D-galactosamine, Exp Mol Pathol (Band 9), Nr. 2, Seite 279-90.
- [120] Van Molle, W.; Denecker, G.; Rodriguez, I.; Brouckaert, P.; Vandenabeele, P. und Libert, C. (1999): Activation of caspases in lethal experimental hepatitis and prevention by acute phase proteins, J Immunol (Band 163), Nr. 10, Seite 5235-41.
- [121] Arrell, D. K.; Neverova, I. und Van Eyk, J. E. (2001): Cardiovascular proteomics: evolution and potential, Circ Res (Band 88), Nr. 8, Seite 763-73. URL: <http://www.circresaha.org/cgi/content/abstract/88/8/763>
- [122] Li, X. P.; Pleissner, K. P.; Scheler, C.; Regitz-Zagrosek, V.; Salnikow, J. und Jungblut, P. R. (1999): A two-dimensional electrophoresis database of rat heart proteins, Electrophoresis (Band 20), Nr. 4-5, Seite 891-7.
- [123] Horwitz, J. (1992): Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 89), Nr. 21, Seite 10449-53.

- [124] Klemenz, R.; Frohli, E.; Steiger, R. H.; Schafer, R. und Aoyama, A. (1991): Alpha B-crystallin is a small heat shock protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 88), Nr. 9, Seite 3652-6.
- [125] Dubin, R. A.; Wawrousek, E. F. und Piatigorsky, J. (1989): Expression of the murine alpha B-crystallin gene is not restricted to the lens, *Mol Cell Biol* (Band 9), Nr. 3, Seite 1083-91.
- [126] Bajramovic, J. J.; Bsibsi, M.; Geutskens, S. B.; Hassankhan, R.; Verhulst, K. C.; Stege, G. J.; de Groot, C. J. und van Noort, J. M. (2000): Differential expression of stress proteins in human adult astrocytes in response to cytokines, *J Neuroimmunol* (Band 106), Nr. 1-2, Seite 14-22.
- [127] Aoyama, A.; Steiger, R. H.; Frohli, E.; Schafer, R.; von Deimling, A.; Wiestler, O. D. und Klemenz, R. (1993): Expression of alpha B-crystallin in human brain tumors, *Int J Cancer* (Band 55), Nr. 5, Seite 760-4.
- [128] Zhou, H.; Li, S. H. und Li, X. J. (2001): Chaperone suppression of cellular toxicity of huntingtin is independent of polyglutamine aggregation, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 51, Seite 48417-424.
- [129] Cavaggioni, A. und Mucignat-Caretta, C. (2000): Major urinary proteins, alpha(2U)-globulins and aphrodisin, *Biochim Biophys Acta* (Band 1482), Nr. 1-2, Seite 218-28.
- [130] Wicks, L. F. (1941), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (Band 48), Seite 395-400.
- [131] Bacchini, A.; Gaetani, E. und Cavaggioni, A. (1992): Pheromone binding proteins of the mouse, *Mus musculus*, *Experientia* (Band 48), Nr. 4, Seite 419-21.
- [132] Brennan, P. A. (2001): The vomeronasal system, *Cell Mol Life Sci* (Band 58), Nr. 4, Seite 546-55.
- [133] Hurst, J. L.; Payne, C. E.; Nevison, C. M.; Marie, A. D.; Humphries, R. E.; Robertson, D. H.; Cavaggioni, A. und Beynon, R. J. (2001): Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins, *Nature* (Band 414), Nr. 6864, Seite 631-634.
- [134] Marchlewska-Koj, A.; Cavaggioni, A.; Mucignat-Caretta, C. und Olejniczak, P. (2000): Stimulation of estrus in female mice by male urinary proteins, *Journal of Chemical Ecology* (Band 26), Nr. 10, Seite 2355-2366.
- [135] Sironi, L.; Tremoli, E.; Miller, I.; Guerrini, U.; Calvio, A. M.; Eberini, I.; Gemeiner, M.; Asdente, M.; Paoletti, R. und Gianazza, E. (2001): Acute-phase proteins before cerebral ischemia in stroke-prone rats: identification by proteomics, *Stroke* (Band 32), Nr. 3, Seite 753-60.
- [136] Kalchman, M. A.; Koide, H. B.; McCutcheon, K.; Graham, R. K.; Nichol, K.; Nishiyama, K.; Kazemi-Esfarjani, P.; Lynn, F. C.; Wellington, C.; Metzler, M.; Goldberg, Y. P.; Kanazawa, I.; Gietz, R. D. und Hayden, M. R. (1997): HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated

huntingtin in the brain, Nat Genet (Band 16), Nr. 1, Seite 44-53.

Anhang

Tab. 12: Identifizierung von Proteinspots, welche sich in ihrer Expression zwischen zwei HD Patienten in Abhängigkeit von Geschlecht und Gehirnregion unterscheiden.

| Striatum | | | | | Parietallappen | | | | |
|-----------------|----------|---------|----------|---------|----------------|---------|----------|---------|--|
| $pH^{[a]}$ # | männlich | | weiblich | | männlich | | weiblich | | |
| | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 | |
| | 112 | 105 | 222 | 123 | 86 | 89 | 141 | 89 | |

| weiblich vs. männlich | | | | |
|-----------------------|----------|---------|----------------|---------|
| Gewebe pH # | Striatum | | Parietallappen | |
| | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 |
| | 21 | 21 | 26 | 25 |

| Parietallappen vs. Striatum | | | | |
|-----------------------------|----------|---------|----------|---------|
| Geschlecht pH # | weiblich | | männlich | |
| | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 |
| | 15 | 6 | 21 | 18 |

| Parietallappen vs. Striatum | | | | |
|-----------------------------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|
| Geschlecht pH # | weiblich vs. männlich | | weiblich vs. männlich | |
| | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 |
| | 32 | 10 | 10 | 5 |

| Unterschiede zwischen HD und Kontrolle gleich | | |
|---|---------|---------|
| pH # | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 |
| | 6 | 0 |

Oben: Anzahl der unterschiedlichen Spots zwischen einem weiblichen (56) oder einem männlichen (93) HD Patienten und alters- und geschlechtsangeglichenen Kontrollen (99 bzw. 104). Mitte: Vergleich der Spotunterschiede in Abhängigkeit von Geschlecht und Gehirnregionen zwischen HD und Kontrolle. Unten: Spots, welche sich bei allen möglichen Kombinationen unterscheiden. Zeichenerklärung: ^[a]pH, pH-Bereich im Gel; #, Anzahl der Spots.

Tab. 13: Untersuchung der HD-spezifischen Spotunterschiede beim vorderen Globus Cinguli bei post-mortem Gehirnen von vier weiblichen HD Patienten.

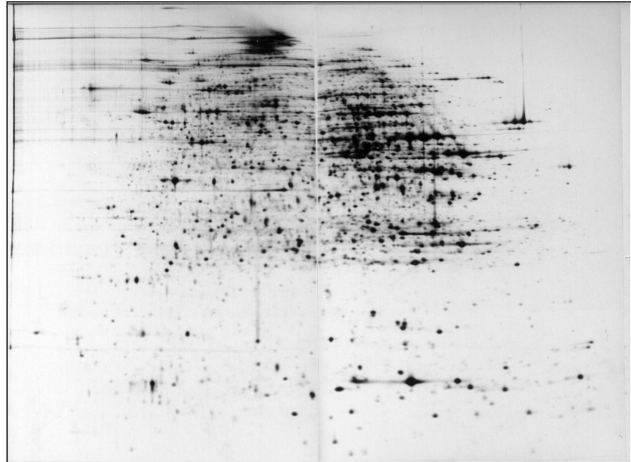
| HD vs. Kontrolle | B3703 B3700 | | B4226 B3816 | | B4356 B3959 | | B4381 B4625 | |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|---------------|
| $pH^{[a]}$ # | 3,5 - 6 98 | 6 - 9,5 103 | 3,5 - 6 189 | 6 - 9,5 135 | 3,5 - 6 69 | 6 - 9,5 (38) | 3,5 - 6 85 | 6 - 9,5 80 |

| | B3703 | | B4226 | | B4356 | | B4381 | |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| pH | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 | 3,5 - 6 | 6 - 9,5 |
| B3703 | | | 11 | 14 | 10 | 12 | 4 | 17 |
| B4226 | 11 | 14 | | | 10 | 5 | 18 | 7 |
| B4356 | 10 | 12 | 10 | 5 | | | 5 | 6 |
| B4381 | 4 | 17 | 18 | 7 | 5 | 6 | | |

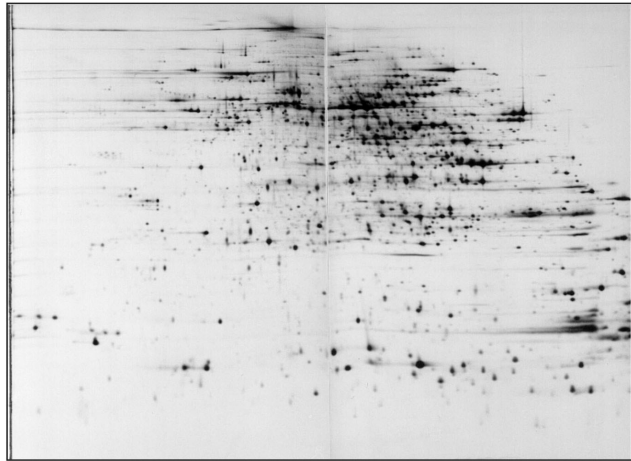
| | pH | # | Gehirn | | | |
|--------|---------|---|--------|-------|-------|-------|
| Gehirn | | | B3703 | B4226 | B4356 | B4381 |
| B3703 | 3,5 - 6 | 1 | + | + | + | - |
| | 6 - 9,5 | 3 | + | + | + | - |
| | | 1 | + | - | + | + |
| B4226 | 3,5 - 6 | 1 | - | + | + | + |
| | 6 - 9,5 | 3 | + | + | + | - |
| | | 1 | + | + | + | + |
| B4356 | 3,5 - 6 | 1 | + | + | + | - |
| | | 1 | - | + | + | + |
| | 6 - 9,5 | 3 | + | + | + | - |
| B4381 | | 1 | + | - | + | + |
| | 3,5 - 6 | 1 | + | - | + | + |
| | | 1 | - | + | + | + |
| | 6 - 9,5 | 1 | + | - | + | + |

Oben: Vergleich von vier HD Gehirnen mit alters- und geschlechtsangeglichenen Kontrollen. Mitte: Vergleich der ausgewerteten HD Gehirne untereinander auf Gemeinsamkeiten bei den Spotunterschieden. Unten: Gleichzeitiges Vorkommen bei verschiedenen HD Gehirnen von zwischen HD und Kontrolle differentiell exprimierten Spots. Es wurden nur Spots berücksichtigt, welche in mindestens 3 HD Gehirnen gleiche Unterschiede in der Expression aufwiesen. Zeichenerklärung: ^[a]pH, pH-Bereich im Gel; #, Anzahl der Spots; +, Spotunterschied kommt bei diesem HD Gehirn auch vor; -, Spotunterschied kommt bei diesem HD Gehirn nicht vor.

Zytoplasma



Membran



Kern

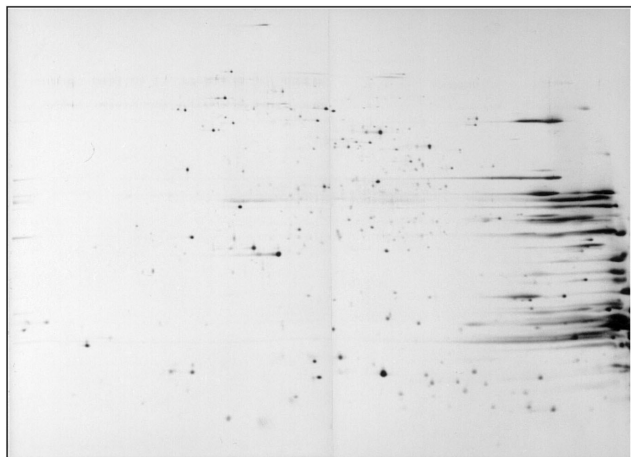


Abb. 23: Darstellung der drei Proteinfractionen am Beispiel der Leber von C57Bl/6 Mäusen

Repräsentative Gele der Zytoplasmatischen/Nukleoplasmatischen (Zytoplasma)-, Membran (Membran)- und Kernfraktion (Kern) sind im einzelnen dargestellt. Alle drei Fraktionen wurden durch Großgel 2D-Elektrophorese aufgetrennt. In der Membranfraktion befinden sich viele Spots, die in der zytoplasmatischen/nukleoplasmatischen Fraktion nicht auftreten und umgekehrt. Pelletspezifische Spots finden sich bevorzugt in der basischen Seite und zytoplasmatische/nukleoplasmatische Fraktion spezifische Spots bevorzugt im sauren pH Bereich. Die Gel der Kernfraktion zeigt sehr basische Proteine. Die Abbildung ist der Veröffentlichung von Joachim Klose zur fraktionierten Proteinextraktion bei Geweben entnommen (Abb. 2; [88]).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Joachim Klose für die Möglichkeit in seinem Labor die Erkrankung Huntington's Chorea mit Hilfe eines Proteomics Ansatzes zu erforschen und seine immerwährende Unterstützung.

Prof. Gillian Bates, Ph. D., hat durch die Bereitstellung von wertvollen Gewebeproben und durch die enge, konstruktive Zusammenarbeit sehr viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Prof. Dr. rer. nat. Harald Saumweber hat mir durch die Übernahme der Position des Doktorvaters und durch konstruktive Kritik während der Arbeit geholfen den Weg bis zum Ende zu gehen.

Mein Dank gilt Patrick Giavalisco, der durch seine Diskussionsbeiträge neue Sichtweisen auf Problemstellungen eingebracht und so die Arbeit sehr bereichert hat.

Die Einsichten vermittelt durch Dr. med. Josef Priller bei Fragen der Neuroanatomie und des Krankheitsverlaufes haben mir sehr beim Verständnis der Erkrankung HD geholfen.

Ich bedanke mich bei Jadranka Segaric für die Aufmunterung und Ermutigung während des Schreibens dieser Arbeit.

Lei Mao hat durch kritische Durchsicht des Manuskripts die Anzahl der Ungereimtheiten im Text reduziert.

Außerdem gilt mein Dank den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, Nicole Steireif, Ivonne Kläre, Marion Herrmann und Janine Stuwe.

Lebenslauf

| | |
|--|--|
| Name: | Claus Zabel |
| Geburtsort: | Marktoberdorf |
| Geburtsdatum: | 18.03.70 |
| Familienstand: | verheiratet |
| Nationalität: | deutsch |
| Schul Ausbildung: Sept. 1976 bis Juni 1989 | zuletzt: Staatliche Fachoberschule Kempten/Allgäu Fachhochschulreife |
| Okt. 1989 bis Sept. 1990 | Grundwehrdienst |
| Studium: Okt. 1990 bis März 1991 Sept. 1991 bis Juni 1996 | Fachhochschule Frankfurt/Main Technische Fachhochschule Berlin Studiengang Biotechnologie |
| <i>Juni 1995 bis Juni 1996</i> | <u>Diplomarbeit:</u> „Vergleich der Vitalitätsverlängerung durch Aktivierung zellulärer oder Ausnutzung transfizierter Schutzmechanismen gegen Zelltod durch Apoptose“ (Note: sehr gut ; Sprache: Englisch) |
| <i>Juni 1995 bis Feb. 1996</i> | Forschungsteil der Diplomarbeit: Ort: Massachusetts Institute of Technology (U.S.A.) Bereich: Zellbiologie/Molekularbiologie; |
| <i>Juli 1995 bis Dez. 1995</i> | Stipendium: Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) Abschluss: Diplom Ingenieur Gesamtpredikat: sehr gut bestanden |
| Wissenschaftliche Arbeit: Okt. 1996 bis Dez. 1996 | Massachusetts Institute of Technology AG Prof. Dr. rer. nat. Gregory Stephanopoulos Abschließende Experimente und Vorbereitung der Veröffentlichung der Diplomarbeit |
| April 1997 bis März 1999 | Hautklinik der Charité - Campus Mitte AG Prof. Dr. rer. nat. P. Walden Themenstellung: Synthetische Liganden für MHC-I Moleküle und ihre Erkennung durch zytotoxische T-Zellen |
| Mai 1999 bis ... | Institut für Humangenetik der Charité – Campus Virchow AG Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. J. Klose Themenstellung: Untersuchung des Proteoms von neurodegenerativen Erkrankungen bei der Maus und beim Menschen |

Eigene Veröffentlichungen

1. Chung, J. D.; **Zabel, C.**; Sinskey, A. J. und Stephanopoulos, G. (1997): Extension of sp2/0 hybridoma cell viability through interleukin-6 supplementation, *Biotechnology & Bioengineering* (Band 55), Nr. 2, Seite 439-446.
2. Bianco, A.; Brock, C.; **Zabel, C.**; Walk, T.; Walden, P. und Jung, G. (1998): New synthetic non-peptide ligands for classical major histocompatibility complex class I molecules, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 44, Seite 28759-65. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/273/44/28759>
3. Bianco, A.; **Zabel, C.**; Walden, P. und Jung, G. (1998): N-Hydroxy-amide analogues of MHC-class I peptide ligands with nanomolar binding affinities, *J Pept Sci* (Band 4), Nr. 8, Seite 471-8.
4. Hin, S.; **Zabel, C.**; Bianco, A.; Jung, G. und Walden, P. (1999): Cutting edge: N-hydroxy peptides: a new class of TCR antagonists, *J Immunol* (Band 163), Nr. 5, Seite 2363-7.
5. Hin, S.; Bianco, A.; **Zabel, C.**; Jung, G. und Walden, P. (2001): Mimetics of a T cell epitope based on poly-N-acylated amine backbone structures induce T cells in vitro and in vivo, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 52, Seite 48790-6. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/276/52/48790>
6. **Zabel, C.**; Chamrad, D. C.; Priller, J.; Woodman, B.; Meyer, H. E.; Bates, G. P. and Klose J. (2002) Alterations in the mouse and human proteome caused by Huntington disease, *Mol Cell Proteomics* (Band 1), Nr. 5, Seite 366-75.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der aufgeführten Hilfsmittel und Literaturquellen angefertigt habe.

Berlin, den 09. September 2002

Claus Zabel